UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Associação da aterosclerose com polimorfismo de TLR2, TLR4, TNF-α e IL-6 e suas expressões em pacientes diabéticos tipo 2

Fernanda Abujamra da Silva

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Tit. Dr. Mario Hiroyuki Hirata

São Paulo
2010

Fernanda Abujamra da Silva

Associação da aterosclerose com polimorfismo de TLR2, TLR4, TNF-α e IL-6 e suas expressões em pacientes diabéticos tipo 2

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Mario Hiroyuki Hirata
orientador/presidente

_____
1º. examinador

_____
2º. examinador

São Paulo, _____ de 2010.

DEDICATÓRIA

À minha família que esteve ao meu lado durante todo tempo e sempre me apoiou. E principalmente a Deus, pois, sem ele nada é possível.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Titular Mario Hiroyuki Hirata, por ter aberto as portas do seu laboratório, pela maravilhosa oportunidade que me proporcionou e por sua dedicação, sempre com conselhos e palavras de incentivo.

À Profa. Associada Rosario Dominguez Crespo Hirata, sempre disposta a auxiliar no desenvolvimento de projetos e a ajudar na resolução de problemas.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de São Paulo, em nome de seu Diretor, Prof. Jorge Mancini Filho.

Ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em nome de seu chefe, Profa. Titular Ana Campa.

À Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxilio financeiro concedido, que resultou na realização do projeto.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de mestrado, concedida no período de março de 2008 a março de 2010.

Aos professores e aos funcionários do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Aos médicos e funcionários do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia de São Paulo, que contribuíram para o andamento do projeto.

Ao Dr Mohamed Saleh do setor de ecografia pela execução dos procedimentos de ultra-som das carótidas.

À Patrícia Viana as Silva, estatística do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia de São Paulo, que tanto ajudou na realização das análises estatísticas.

Aos pacientes, que contribuíram de maneira anônima para este estudo.

Aos meus colegas do Laboratório de Biologia Molecular aplicada ao Diagnóstico do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

RESUMO

SILVA, Fernanda Abujamra. **Associação da aterosclerose com polimorfismo de TLR2, TLR4, TNF-α e IL-6 e suas expressões em pacientes diabéticos tipo 2.** 2010. 117f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêutica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

O Diabete tipo 2 é uma síndrome heterogênea caracterizada por resistência à insulina e /ou diminuição relativa da função secretora das células β pancreáticas. Os Diabéticos têm risco maior de desenvolver aterosclerose, que é uma doença inflamatória crônica que envolve a resposta imune. Os TLRs sinalizadores da resposta imune inata que ativam vias que participam na regulação da inflamação podem estar associados com a patogênese da aterosclerose. Além disso, são capazes de induzir a resistência à insulina. Estudos sugerem que a inflamação é um fator chave na aterogênese em diabéticos tipo 2. Citocinas pró-inflamatórias, como a IL-6 e o TNF-α, são produzidas pelo tecido adiposo em grande quantidade em indivíduos obesos, especialmente em pacientes com DM2. Este estudo tem por objetivo avaliar a associação dos genes do TLR2, TLR4, TNF-α e IL-6 com o diabetes tipo 2 e com a aterosclerose. Foram selecionados sessenta e um indivíduos DM2 e trinta e nove indivíduos normoglicêrmicos (grupo controle) na seção de Coronárias do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia (São Paulo, Brasil). O ultra-som de carótida foi utilizado para avaliar a presença de aterosclerose. Os polimorfismos dos genes TLR4 (Thr399Ile), TLR2 (Arg753Gln), and IL6 (-174G>C) foram identificados pela PCR-RFLP. O polimorfismo dos genes TLR4 (Asp299Gly) and TNF-α (-308G>A) foram detectados por HRM. A expressão do mRNA nos leucócitos do sangue periférico foi mensurado pela PCR em tempo real utilizando o gene GAPD como gene referência. No grupo diabéticos, indivíduos portadores do alelo *IL-6* -174C apresentaram colesterol total, VLDL-C e triglicérides que os portadores do genótipo GG (respectivamente, p=0,007, p=0,006 e p= 0,030). A expressão de TLR4 foi maior em indivíduos do grupo diabéticos que no grupo controle (p=0,029). Em DM2, o genótipo TNF-α -308GG foi associado com o aumento da expressão do mRNA do gene TNF-α (p=0,031) e maiores concentrações de fibrinogênio que os portadores do alelo -308A (genótipo GA+AA) (p=0,020). Em indivíduos com aterosclerose o alelo *TLR4* 299Gly foi associado com altas concentrações de glicemia pós 75g de glicose (p=0,012). E portadores do alelo *IL6* -174C apresentaram maiores concentrações de colesterol total e LDL-C que nos portadores do genótipo GG (ambos p<0,001). O polimorfismo -174G>C (alelo C) e o DM2 mostraram serem fatores de risco para a aterosclerose (odds ratio respectivamente: 3,0 and 16,962). E, o sexo masculino e a menopausa mostraram serem fatores de risco para o DM2.

Palavras-chave: TLRs. Citocinas inflamatórias. Diabetes Melito. Aterosclerose. Polimorfismo.

ABSTRACT

SILVA, Fernanda Abujamra. **Association of the atherosclerosis with TLR2, TLR4, TNF-α e IL-6 polymorphisms and their expressions in type 2 diabetics patients.** 2010. 117f. Dissertation (Masters Degree) – Faculdade de Ciências Farmacêutica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Type 2 diabetes is an heterogeneous syndrome characterized by the resistance to insulin and/or relative decrease of the secretion of insulin of the pancreatic β cells. T2DM are in high risk of develop atherosclerosis, that is a chronic inflammatory disease involving immune response. Many existing in the atherosclerotics plaques the TLRs are signaling for immune innate response, that activate inflammatory cells involved in progression of atherosclerotic disease. TLRs can be also associated with induction of the resistance to insulin. Many studies have been suggesting that inflammation is a key factor of the progression of atherosclerotic disease in type 2 diabetes. Proinflammatory cytokines, such as IL-6 and TNF-α, are produced by the adipose tissue in high concentration in obese individuals, mainly among patients with T2DM. This study aims to investigate the relationship between TLR2, TLR4, TNF-α and IL-6 gene expression and polymorphisms with T2DM and atherosclerosis. Sixty-one T2DM and thirty nine normoglycemic (control group) individuals were selected at the Coronary Session of the Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia (Sao Paulo, Brazil). Carotid artery ultrassonography was used to evaluate the atherosclerotic status. Polymorphisms of TLR4 (Thr399Ile), TLR2 (Arg753Gln), and IL6 (-174G>C) genes were detected by PCR-RFLP. TLR4 (Asp299Gly) and TNFA (-308G>A) gene polymorphisms were detected by HRM. Blood leukocytes mRNA expression was measured by real time PCR using GAPD as a reference gene. In T2DM, individuals carrying *IL6* -174C allele had higher total cholesterol, VLDL-c and triglycerides than the genotype GG carriers (respectively, p=0,007, p=0,006 and p= 0,030). TLR4 mRNA expression was higher in T2DM than in control individuals (p=0,029). In T2DM group, TNF-α -308GG genotype was associated with increased TNF-α mRNA expression levels (p=0,031) and higher fibrinogen levels than those carrying -308A allele (GA+AA genotypes) (p=0,020). In individuals with atherosclerosis *TLR4* 299Gly allele was associated with high post-test glucose levels (p=0,012). And carrying *IL6* -174C allele had higher total cholesterol and LDL-C than the genotype GG carriers (both p<0,001). The polymorphism -174G>C and the T2DM was related with risk for atherosclerosis (odds ratio respectively: 3,0 and 16,962) and, the male sex and menopause was related with risk for T2DM (odds ratio respectively: 3,401 and 3,025).

Keywords: TLRs. Inflammatory cytokines. Diabetes mellitus. Atherosclerosis. Polymorphism.

LISTA DE ABREVIATURAS

cDNA	Ácido Desoxirribonucléico Complementar
CT	Colesterol Total
Ct	Cycle Treshold
DM1	Diabete melito tipo 1
DM2	Diabete melito tipo 2
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DP	Desvio Padrão
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
EHW	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
GAPDH	Gliceraldeído 3 Fosfato Desidrogenase
HbA1c	Hemoglobina Glicada
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
HDL-C	Colesterol da HDL
HOMA-beta	Homeostasis Model Assessment – função secretora da célula beta
HOMA-IR	Homeostasis Model Assessement – resistência à insulina
HRM	Desnaturação de alta resolução
HSP	Proteína de Choque Térmico
IL-6	Interleucina-6
IMC	Índice de Massa Corpórea
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
LDL-C	Colesterol da LDL
LTSP	Leucócitos Totais do Sangue Periférico

mRNA	RNA Mensageiro
NF-κB	Fator Nuclear-κB
ox-LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade oxidada
PCRus	Proteína C-reativa Ultra Sensível
PCR	Reação em Cadeia pela Polimerase
RFLP	Polimorfismo de Tamanho de Fragmentos de Restrição
RI	Resistência à insulina
RNA	Ácido Ribonucléico
RT-PCR	Transcrição Reversa Seguida da PCR
SB	Tampão Tetraborato de Sódio
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SNP	Polimorfismo de um único nucleotídeo
T4L	Tetraiodotironina Livre
TBE	Tampão Tris Borato EDTA
TLR	Receptor Toll-like
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TSH	Hormônio Tireoestimulante
VLDL	Lipoproteína de Muito Baixa Densidade
ΔCt	Delta Ct
ΔΔCt	Delta Delta Ct

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO..... 11
2. OBJETIVOS..... 20
2.1 Geral..... 20
2.2 Específicos..... 20
3. CASUISTICA, MATERIAL E MÉTODOS..... 21
3.1 Casuística..... 21
3.2 Amostras Biológicas..... 22
3.3 Determinação dos Parâmetros Bioquímicos..... 22
3.3.1 Cálculo dos Índices Homa-IR e Homa-Beta..... 23
3.4 Ultra-som de carótida..... 24
3.5 Extração e Análise do DNA Genômico..... 24
3.6 Genotipagem do TLR2, TLR4 (Thr399Ile) e IL-6 pela PCR-RFLP..... 25
3.6.1 Ensaios de RFLP..... 27
3.7 Genotipagem do TLR4 (Asp299Gly) e TNF-α pela técnica de HRM..... 28
3.8 Extração e Análise do RNA Total..... 29
3.8.1 Extração de RNA Total de Leucócitos Totais do Sangue Periférico..... 29
3.8.2 Análise do RNA Total..... 29
3.9 Análise da Expressão de mRNA pela PCR em Tempo Real..... 30
3.10 Análise Estatística..... 34
4. RESULTADOS..... 36
4.1 Resultados dos grupos diabéticos e controle..... 36
4.1.1 Dados Biodemográficos 36
4.1.2 Análise dos polimorfismos Arg753Gln, Thr399Ile e -174 G>C..... 39
4.1.3 Análise dos polimorfismos Asp299Gly e -308G>A..... 43
4.1.4 Resultados da expressão gênica..... 52
4.1.5 Resultados de efeito dos polimorfismos na expressão gênica.... 56
4.2 Resultados dos grupos com aterosclerose e sem aterosclerose..... 58
4.2.1 Dados Biodemográficos 59
4.2.2 Análise dos polimorfismos Arg753Gln, Thr399Ile, -174 G>C, Asp299Gly e -308G>A..... 60
4.2.3 Resultados da expressão gênica..... 68
4.2.4 Resultados de efeito dos polimorfismos na expressão gênica.... 71
4.3 Resultados dos grupos DM2 com aterosclerose e DM2 sem aterosclerose..... 73
4.3.1 Dados Biodemográficos 73
4.3.2 Análise dos polimorfismos Arg753Gln, Thr399Ile, -174 G>C, Asp299Gly e -308G>A..... 75
4.3.3 Resultados da expressão gênica..... 84
4.3.4 Resultados de efeito dos polimorfismos na expressão gênica.... 87
4.4 Resultados de estimativa de risco..... 88
5. DISCUSSÃO..... 90
6. CONCLUSÕES..... 98
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 99
8. ANEXOS..... 106

1. INTRODUÇÃO

A prevalência do Diabetes Melito (DM) está aumentando rapidamente, tanto em paises desenvolvidos quanto em paises em desenvolvimento. Mudanças na prevalência e incidência do DM constituem uma importante preocupação que incorre certamente em problema de saúde pública. Estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS) indicam que esta prevalência deve aumentar de 171 milhões de pessoas em 2000, para 366 milhões de pessoas em 2030. (BERRY *et al*., 2007).

A prevalência do DM na população brasileira entre 30-69 anos é de 7,6%, atingindo cifras próximas a 20% na população acima dos 70 anos. Cerca de 50% dessas pessoas ainda não foram diagnosticadas (PAIVA *et al.*, 2006). Relatos do Sistema Único de Saúde (SUS) mostram que o DM é a quinta indicação de hospitalização e está entre as dez maiores causas de mortalidade no país (GOMES, 2006).

A classificação do DM é baseada na etiologia e não no tipo de tratamento. A classificação proposta pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pela Associação Americana de Diabetes (ADA) inclui quatro classes clínicas: DM tipo 1 (DM1), DM tipo 2(DM2), outros tipos específicos de DM e Diabete Melito gestacional (ALBERTI et al., 1999; SKELLY, 2006).

O Diabetes tipo 2 é uma síndrome heterogênea caracterizada por resistência à insulina e / ou diminuição relativa da função secretora das células β pancreáticas. É a forma presente em 90%-95% dos casos de diabete (TANIGUCHI *et al*., 2007).

A resistência à insulina está relacionada com diversas condições aterogênicas como obesidade, dislipidemia, intolerância a glicose e hipertensão. Por isso, a

resistência à insulina é considerada um fator de risco importante para o desenvolvimento da aterosclerose (MATSUMOTO *et al*., 2008). A aterosclerose é a maior causa de morbidade e mortalidade entre os pacientes diabéticos (RAZANI *et al*., 2008).

A aterosclerose é uma doença que ocorre em sítios de susceptibilidade nas artérias de maior calibre. Ela resulta de interações múltiplas entre estimulo de injúria e respostas de cura da parede arterial. Ela é iniciada pela retenção, oxidação e modificação de lipídeos, que provoca inflamação crônica, e por fim causa a trombose ou estenose (INSULL, 2009).

O ponto de partida é a alteração da função endotelial, secundário ao dano mecânico ou vascular, o qual é seguido por uma cascata inflamatória que envolve os mecanismos humorais (citocinas, fatores de crescimento) e celulares (aumento da quimiotaxia, aderência e infiltração de células inflamatórias). Esses fatores combinados de maneira desequilibrada e progressiva levam a uma resposta final fribroproliferativa. Após a injúria tecidual ocorre a interação direta célula-célula e a secreção de fatores quimiotáticos e de crescimento, resultando no recrutamento de monócitos para a região sub intima, proliferação das células de músculo liso (SMC - smooth muscle cell), e aumento da síntese das proteínas de matriz. Os monócitos recrutados transformam-se em macrófagos, que fagocitam os lipídeos oxidados, havendo acúmulo em seu interior, e por fim transformam-se em células espumosas (MADAN *et al.,* 2008).

As mudanças que ocorrem nas artérias durante o desenvolvimento da aterosclerose são significativamente influenciadas por fatores de risco como a hipertensão, o fumo e o diabete, bem como determinantes genéticos de susceptibilidade ou resistência a aterosclerose. O mecanismo pelo qual estes fatores de

risco influenciam no processo de desenvolvimento da aterosclerose ainda necessita de melhores estudos (INSULL, 2009).

O tecido adiposo é um órgão endócrino e paracrino biologicamente ativo. A teoria de que ele pode estar envolvido na aterosclerose do diabético tem muitas implicações para a intersecção da inflamação, aterosclerose, e DM2, especialmente a partir de dados clínicos que sugerem que a obesidade é um fator muito importante nas anormalidades metabólicas, que aparece antes e durante o diabete. A inflamação no tecido adiposo provavelmente contribui para o metabolismo anormal e aterosclerose no DM2 (MAZZANE *et al*., 2008).

Acredita-se que a combinação de predisposição genética, excesso de nutrientes, e pouca atividade física contribuem para o trio: obesidade, resistência à insulina, e inflamação. Embora controvérsias existam sobre a exata seqüência de desenvolvimento dessas anormalidades, parece claro que elas estão intimamente ligadas, e que têm efeitos relacionados. A principal consequência desse trio é o aparecimento de uma ampla variedade de anormalidades metabólicas, como a hiperglicemia, hiperinsulinemia e produtos finais de glicação avançada (AGEs – advanced glycation end products), concentrações alteradas de citocinas e adipoquinas, elevadas concentrações de ácidos graxos livres e dislipidemia. Esses fatores em conjunto contribuem para acelerar o desenvolvimento de aterosclerose entre os indivíduos com resistência a insulina (SCHWARTZ *et al*., 2006). (**Figura 1**).

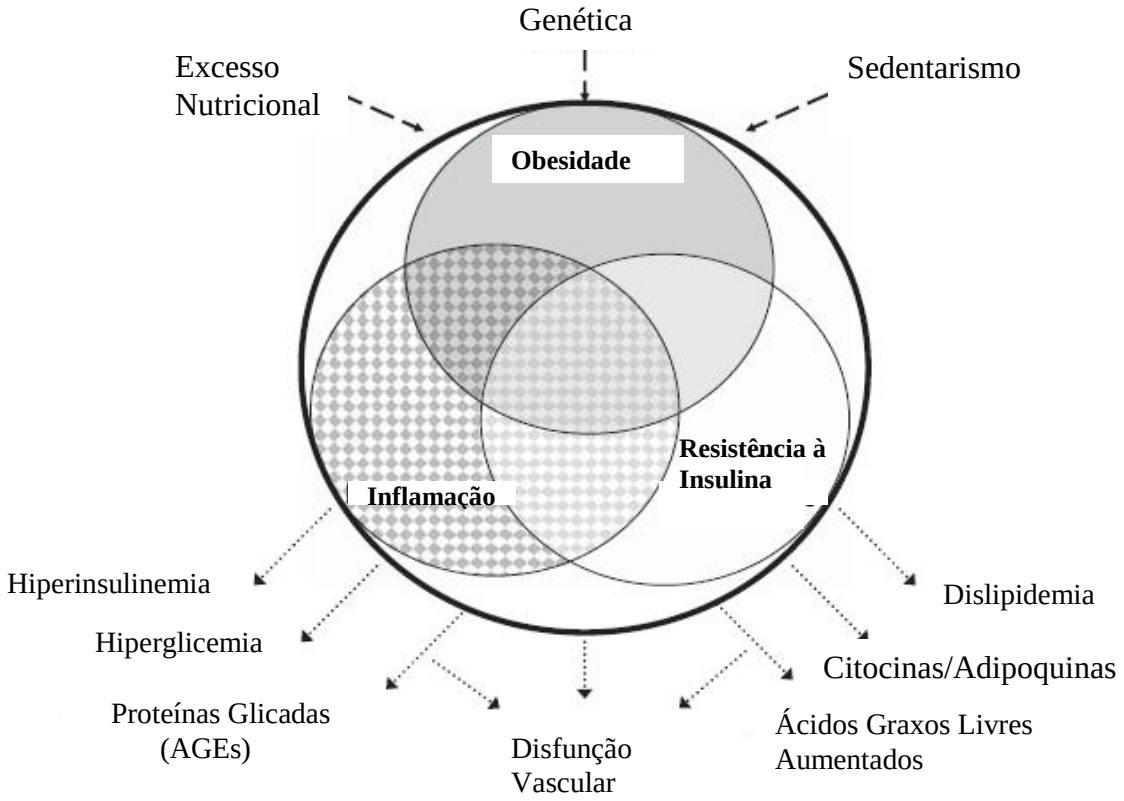


Figura 1. Fatores associados com a resistência à insulina que contribuem para o dano vascular (adaptado de SCHWARTZ *et al.*, 2006).

O estresse oxidativo e a inflamação no tecido adiposo podem ser exacerbados pela hiperglicemia. Ácidos graxos liberados pelo tecido adiposo provavelmente sinalizam para os macrófagos por meio de vias que envolvem os receptores Toll-like (TLRs - Toll-like receptors), levando a ativação do fator nuclear-κB (NF-κB) (MAZZANE *et al*., 2008).

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica que envolve uma resposta imune durante seu inicio e no seu progresso (SATOH *et al*., 2008). Muitos receptores de

superfície de células inflamatórias presentes nas placas ateroscleróticas estão envolvidos com a resposta imune inata. Dentre eles os TLRs, que estão associados com a patogênese da aterosclerose (PASTERKAMP *et al*., 2008). Os TLRs, são conhecidos como iniciadores dos sinais que ativam as vias NF-$_{k}$B, JNK, e SOCS, as quais participam na regulação da inflamação e têm demonstrado , além disso, serem capazes de induzir a resistência à insulina (SHI *et al*., 2006).

Os TLRs são uma família de receptores transmembrana do tipo I caracterizados por uma região extracelular altamente variável. Estruturalmente os TLRs são caracterizados pela presença de um ectodomínio envolvido no reconhecimento do ligante, o qual é constituído principalmente de repetições ricas em leucina e um domínio de sinalização citoplasmática, domínio do receptor Toll/IL-1 (TIR), que mostra ter uma extraordinária similaridade com a família do receptor IL-1, o qual é essencial para a transdução de sinal. Já foram identificados 11 TLRs humanos, 10 dos quais são funcionais (VEGA & MARTÍN, 2008).

Os TLRs reconhecem padrões moleculares associados a patógenos conservados e induzem a resposta imune inata que é essencial para a defesa do hospedeiro (DASU *et al*., 2008). Entretanto certos TLRs são modulados também por moléculas endógenas incluindo lipídios, ácidos graxos, lipoproteínas de baixa densidade oxidadas (ox-LDL) e proteínas de choque térmico (HSP). Quando os TLRs presentes em monócitos são ativados por esses ligantes endógenos, levam a ativação do fator de transcrição NF-κB, via pela qual está ligado a produção de citocinas pró-inflamatórias e expressão de moléculas co-estimulatórias resultando na indução da resposta imune adaptativa (SATOH *et al*., 2008).

Dois membros da família de receptores TLR são de particular interesse com relação à aterosclerose. O TLR4 que é um receptor de lipopolissacarídeos, um componente externo da parede celular de bactérias Gram-negativas. O aumento da expressão do TLR4 no ateroma tem também associação com a ativação do fator de transcrição NF-κB que tem um papel importante na indução da expressão de citocinas pró-inflamatórias sugerindo que o TLR4 é importante no inicio e na progressão da aterosclerose. O TLR2 reconhece, entre outras, bactérias Gram-negativas, lipoproteínas, e lipopeptídeos de várias bactérias diferentes e também elementos da parede celular de fungos (LABRUM, et al., 2007).

Arbour e colaboradores (2000) descobriram dois polimorfismos de um único nucleotídeo no gene TLR4 que resultam em substituição de aminoácidos no domínio extracelular do receptor, que alteram a estrutura deste. Estas variantes, Asp299Gly e Thr399Ile estão associadas com uma redução no risco da doença cardiovascular, incluindo espessamento da camada íntima e média e risco de evento agudo coronário. Isso provavelmente ocorre, pois, estes polimorfismos levam à diminuição da concentração das citocinas pró-inflamatórias, proteínas de fase aguda e moléculas de adesão solúveis (BOEKHOLDT *et al*., 2003; LABRUM, *et al.,* 2007).

A substituição de uma adenina por uma guanina no nucleotídeo 896 a jusante do sítio de inicio da transcrição no gene TLR4, resulta na troca de uma asparagina por uma glicina na posição 299 da seqüência de aminoácidos gerando o polimorfismo Asp299Gly (AMEZIANE *et al*., 2003). Este polimorfismo reduz os efeitos da transdução de sinal por este receptor, diminuindo a resposta inflamatória para patógenos gram negativos, e diminuindo o risco de aterosclerose na artéria carótida e eventos coronarianos agudos (AMEZIANE *et al.*, 2003, SCHWARTZ *et al*.,2005).

Rudosfsky e Colaboradores (2004) analisaram que o polimorfismo Thr399Ile modifica a região de reconhecimento dos ligantes no receptor TLR4 protegendo contra a ligação de LDL em pacientes com neuropatia diabética.

O alelo 299Gly e 399Ile dos polimorfismos Asp299Gly e Thr399Ile do gene TLR4, respectivamente, são associados com a proteção de DM2, esse efeito se deve ao fato da alteração do sistema imune inato por esses polimorfismos (BAGAROLLI *et al*., 2009).

O TLR2 possui um polimorfismo de troca de um único nucleotídeo que resulta em uma troca de aminoácido, Arg753Gln. Esse polimorfismo foi associado com a febre reumática aguda em crianças, e é reportado como fator de risco para o desenvolvimento de choque séptico no curso de infecção por bactérias gram-positivas. Por outro lado, esse polimorfismo tem um efeito protetor na restenose coronária após angioplastia (LABRUM, *et al.,* 2007; MERX *et al*.,2007).

Evidências sugerem que a inflamação é um fator chave na aterogênese em diabéticos tipo 2. Citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral alpha (TNF-α), são produzidas pelo tecido adiposo em grande quantidade em indivíduos obesos, especialmente em pacientes com DM2. Essas moléculas inflamatórias estão elevadas em pacientes com resistência à insulina e predizem o risco cardiovascular (ANTONIADES *et al*., 2007; HAJER *et al.,* 2008).

A IL-6 foi uma das primeiras citocinas implicadas com o prognóstico da resistência à insulina e da doença cardiovascular (TILG & MOSCHEN, 2008). Esta citocina é em marcador local e circulante da inflamação da placa coronária. Além disso, a IL-6 é um importante estimulador da reação de fase aguda, agindo no fígado e no hipotálamo levando a liberação de proteína C-reativa, proteína sérica amilóide A e

fibrinogênio, todos com conhecido papel pró-inflamatório (MADAN *et al.,* 2008). É sabido que a proteína C-reativa pode diretamente amplificar a injúria na parede do vaso (MAZZANE *et al*., 2008). A elevação de citocinas pró-inflamatórias como a IL-6, pode ter um papel etiológico na resistência à insulina por interferir na sinalização da insulina (STEPHENS *et al.*, 2007).

O TNF-α tem papel importante no início da resposta inflamatória. Estudos em humanos e em modelos animais associam esta citocina com a formação da placa aterosclerótica. O TNF-α é produzido por macrófagos e células espumosas, entre outras. Esta citocina promove a infiltração celular e formação da placa e estimula a produção de outras citocinas o que aumenta a instabilidade da placa levando embolia e risco de trombose (JEFFERIS *et al.*, 2008). O TNF-α também está relacionado com a resistência à insulina e obesidade. Sua concentração aparece aumentada em pacientes obesos, e essa concentração elevada estimula a fosforilação do primeiro mensageiro da via de transmissão de sinal da insulina, em serina ao invés de tirosina, resultando em dificuldade na transdução do sinal. Essa fosforilação mostra ser um dos fatores chave que interrompe a sinalização do receptor de insulina levando a um quadro de resistência à insulina. (TILG & MOSCHEN, 2008).

Muitas variações na região promotora do gene da IL-6 localizado no cromossomo 7 foram identificadas, dentre essas variações está o polimorfismo -174G>C, que está relacionado com a aterosclerose e com o DM2. O alelo C desse polimorfismo demonstrou ter um efeito de proteção em indivíduos com idade maior que 56 anos e o alelo G foi correlacionado com um aumento na espessura da camada íntima e média, um indicador de aterosclerose (BERG *et al*., 2008; VAXILLAIRE *et al*., 2008).

Para esse polimorfismo também foi identificado que o genótipo C-174C foi associado com o estado de resistência a insulina e é um fator de risco para o desenvolvimento do DM2 (KUBASZEC *et al*., 2003).

O polimorfismo -308G>A localizado na região promotora do gene do TNF-α também está relacionado com o DM2. Entretanto uma relação direta entre os mediadores inflamatórios e o mecanismo genético do DM não está completamente estabelecida (VAXILLAIRE *et al*., 2008).

O alelo A do polimorfismo -308 G>A está associado com o aumento da expressão de TNF-α. Portanto, essa variação genética pode estar relacionada com o aumento da susceptibilidade e severidade das doenças inflamatórias como a aterosclerose (SOOKOIAN *et al*., 2005).

O presente estudo tem como objetivo avaliar a relação existente entre os polimorfismos do TLR2, TLR4, IL-6 e TNF-α, no diabetes e na aterosclerose.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a associação dos polimorfismos e expressão dos genes TLR2, TLR4, TNF-α e IL-6 com o diabetes tipo 2 e com a aterosclerose.

2.2 Específicos

2.2.1 Avaliar a associação dos polimorfismos Thr399Ile e Asp299Gly do gene TLR4, Arg753Gln do gene TLR2, -308G>A do gene TNF-α e -174G>C do gene IL-6 com valores de TNF-α e IL-6 no plasma e com a aterosclerose em pacientes com diabetes melito tipo 2.

2.2.2 Relação dos polimorfismos estudados com os dados bioquímicos, biodemográficos e antropométricos.

2.2.3 Avaliar a expressão dos genes TLR2, TLR4, TNF-α e IL-6 em leucócitos totais do sangue periférico e associá-los com valores de TNF-α e IL-6.

2.2.4 Determinar as freqüências gênicas e genotípicas dos polimorfismos estudados e relacioná-las com a expressão de mRNA.

3. CASUISTICA, MATERIAIS E MÉTODOS.

3.1 Casuística

Foram selecionados 100 pacientes na seção de Coronárias do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia (IDPC). Desses, 61 são diabéticos e 39 são normoglicêmicos (grupo controle), diagnosticados de acordo com os critérios do Consenso da ADA (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION - www.ada.org) junho de 2008. Esses indivíduos também tiveram a presença ou ausência de aterosclerose diagnosticada com ultra-som de carótida.

Os pacientes selecionados foram informados sobre o protocolo do estudo que foi previamente aprovado pelo comitê de ética do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia e somente participaram os que assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo C).

Os critérios de inclusão foram: indivíduos de ambos os gêneros, com idade entre 30 e 70 anos, todas as etnias; duas glicemias em jejum com valores acima de 126mg/dL, ou superiores 140 mg/dL 2h após 75 g de glicose. Os dados dos pacientes foram obtidos e registrados por meio de um questionário (Anexo D).

Foram excluídos pacientes em uso de bloqueadores β-adrenérgicos, inibidores da enzima conversora de angiotensina, diuréticos tiazídicos, corticosteróides, fibratos e agentes hipoglicemiantes orais tais como: metformina, repaglinida, acarbose; pacientes com glicemia de jejum demasiadamente alta (> 300mg/dL), que necessitavam de terapia insulínica, logo após o diagnóstico ou durante o tratamento; pacientes que necessitavam de terapia combinada com hipoglicemiantes orais e mulheres grávidas.

3.2 Amostras Biológicas

Foram coletadas amostras de sangue periférico (40mL), após jejum mínimo 12 h, utilizando o sistema de coleta a vácuo (Vacutainer^{TM} Becton Dickinson Company, Plymouth, Reino Unido).

Para a extração do DNA genômico, extração de RNA total, dosagem da hemoglobina glicada (Hb1Ac) e hemograma completo foram utilizados tubos com o anticoagulante EDTA. O tubo de citrato de sódio foi utilizado para a determinação de fibrinogênio no plasma. As amostras colhidas sem anticoagulante foram utilizadas para a obtenção do soro, no qual foram determinadas as dosagens bioquímicas e atividades enzimáticas no soro.

3.3 Determinações dos Parâmetros Bioquímicos

A glicemia foi determinada através de método enzimático colorimétrico (TRINDER, 1969) e a Hb1Ac, por imunoturbidimetria. As concentrações séricas de colesterol total, HDL-C e triacilglicerol foram determinadas por método enzimático colorimétrico (SIEDEL *et al.*, 1983; SIEDEL *et al.*, 1993; SUGIUCHI, *et al.*, 1995) e as de VLDL-C e LDL-C foram calculadas segundo a fórmula de Friedwald (FRIEDWALD, 1967). As concentrações séricas de uréia foram determinadas através do método enzimático (TALKE & SCHUBERT, 1965) e as de creatinina foram determinadas pelo método colorimétrico (JAFFE, 1866).

As determinações bioquímicas foram realizadas utilizando kits comerciais em um analisador automático (Dimension RXL, Dade Behring, Alemanha). A monitorizarão da precisão, exatidão e controle de qualidade das determinações séricas foram realizadas

pela determinação concomitante de soros controle normal e patológico comerciais (Dade Behring, Alemanha).

As concentrações séricas de T4L foram determinadas pelo método de imunoensaio competitivo (WENZEL, 1981) e as concentrações séricas de TSH (WENZEL, 1981) e insulina (BABSON, 1991) pelo método imunométrico utilizando analisador automático Immulite com sistema de detecção por quimiluminescência (DPC Medlab, Los Angeles, EUA).

O hemograma foi realizado por métodos de impedânciometria e a contagem diferencial da série branca foi realizada por citometria de fluxo, num sistema automatizado (Pentra 80, ABX, Horiba, Japão).

Para determinação das concentrações de IL-6 e TNF-α foram utilizados testes de imunoensaios enzimáticos do tipo multiplex, utilizando o Kit *HUMAN CYTOKINE/CHEMOKINE LINCOplex* (Linco Research, MO, EUA).

3.3.1 Cálculo dos Índices Homa-IR e Homa-Beta

O índice Homa-IR, que avalia a resistência insulínica, foi calculado utilizando a fórmula: Insulina (mU/mL) x (glicemia mg/dL X 0.05551) / 22,5. Para o cálculo do índice beta, que avalia a função secretora da célula beta, foi utilizada a fórmula: 20 x insulinemia (mU/mL) / (glicemia mg/mL X 0.05551) - 3,5) (MATTHEWS *et al.,* 1985).

3.4 Ultra-som de carótida

O ultra-som foi realizado no setor de ecografia por meio de ultra-som de alta resolução, transdutor do tipo Phased-array multi frequencial da marca Vivid 7(GE–EUA), HDI 5000 e HDI 3500(Philips-EUA) por um único médico Dr Mohamed responsável do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia.

3.5 Extração e Análise de DNA Genômico

O DNA genômico foi extraído dos leucócitos totais do sangue periférico (LTSP), após lise dos eritrócitos, utilizando o método de precipitação salina desenvolvido em nosso laboratório (SALAZAR et al., 1998). As amostras de DNA foram armazenadas a -20º C.

A integridade das amostras de DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 0,8% utilizando tampão TBE 0,5X [Tris-HCl a 45 mM, ácido bórico a 45 mM e EDTA a 1mM (pH 8,0)] (SAMBROOK & RUSSEL, 2001). A separação eletroforética foi realizada a 100 v, 60 mA, por 30 min utilizando fonte modelo EPS 200 (GE Healthcare, Amersham Biosciences do Brasil, São Paulo, SP), em cuba horizontal (Gibco BRL, Life Technologies Inc. Gaithersburg, MD, EUA). Como referência foi utilizado um marcador de DNA de 100 bp (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA). Os DNAs foram visualizadas sob luz UV, após coloração do gel com brometo de etídio (0,5 mg/mL) (SAMBROOK & RUSSEL, 2001) e fotodocumentadas em sistema de captura de

imagem ChemiImager™ 4400 (v.5.5) (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA, EUA).

A quantificação de DNA foi realizada por espectrofotometria, utilizando o espectrofotometro Nanodrop modelo ND-100 (NanoDropTechnologies, Wilmington, Delaware, USA) a 260nm, e a pureza do DNA determinada pela relação A260nm/A280nm (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

3.6 Genotipagem do *TLR2, TLR4 (*Thr399Ile) e *IL-6* pela PCR-RFLP

Foram genotipados os polimorfismos Arg753Gln do gene *TLR2*, Thr399Ile do gene *TLR4* e -174G>C do gene *IL-6*, empregando-se a reação em cadeia pela polimerase (PCR), associada à análise de polimorfismo por fragmento de restrição (RFLP).

Os iniciadores utilizados foram selecionados com auxílio do programa Primer Premier® v. 5.0 (Premier Biosoft International, EUA), de acordo a seqüência disponível [número de acesso NM_003264 (*TLR2),* NM_138554 (*TLR4) e* NM_000600 (*IL-6*)] no Banco de genes (*GenBank*) do *National Institute of Health* (NIH) (www.ncbi.nlm.nih.gov). No **Quadro 1**, estão descritos os iniciadores utilizados na PCR para os polimorfismos estudados.

Nas PCRs foram utilizados de 5 a 20 pmol dos iniciadores (Invitrogen, MD, EUA), 0,2 mmol/L de dNTPs (Amersham Biosciences, NJ, EUA), e 1 U de DNA polimerase (Biotools, Madri, Espanha) e tampão da PCR (Tris-HCl a 75mM pH 9.0, MgCl2 a 2mM, KCl a 50 mM, (NH4)2SO4 a 20mM (Biotools, Madri, Espanha), e 50ng de DNA genômico em um volume total de 25µL. A PCR para o polimorfismo *TLR2* Arg753Gln foi

programada para uma etapa de desnaturação inicial à 95ºC por 1 min; seguida da etapa de amplificação com 30 ciclos de desnaturação de 95ºC por 1 min, hibridação a 64ºC por 1 min, e etapa de extensão à 72ºC por 1 min; e etapa de extensão final à 72ºC por 10 min. O tamanho do produto gerado foi de 329 bp.

Quadro 1 – Iniciadores utilizados na PCR

Polimorfismos	PRIMERS (5' – 3')	Tamanho do Produto de PCR
TLR2		
Arg753Gln	5' CTGGAGCCCATTGAGAAAAA 3' 5' CGCAGCTCTCAGATTTACCC 3'	329bp
TLR4		
Thr399Ile	5' GGTTGCTGTTCTCAAAGTGATTTTGGGTCA 3' 5' AGGAAGTTTTCCTGGAAAGAATTGCCAGC 3'	299bp
IL-6		
-174G>C	5' TGACTTCAGCTTTACTCTTTGT 3' 5' CTGATTGGAAACCTTATTAA 3'	226bp

A PCR para o polimorfismo *TLR4* Thr399Ile mostrou mais eficiência com 30 ciclos de amplificação com a etapa de desnaturação a 95ºC por 1 min, hibridização a 63,1ºC por 1 min e etapa de extensão a 72ºC por 1 min; e etapa de extensão final à 72ºC por 10 min. O produto obtido foi de 299 bp.

A PCR para o polimorfismo *IL-6* -174G>C foi programada para uma etapa de desnaturação inicial à 95ºC por 1 min; seguida da etapa de amplificação com 30 ciclos de desnaturação de 95ºC por 1 min, hibridação a 59ºC por 1 min, e etapa de extensão à 72ºC por 1 min; e etapa de extensão final à 72ºC por 10 min. O tamanho do produto gerado foi de 226 bp. Todas as PCRs foram realizadas no aparelho PTC-200 (MJ Research Inc. Walthan, MA, EUA).

Os produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão SB (tetraborato de sódio decahidratado 5mM, pH 8,5)1X, visualizadas sob luz UV, após coloração do gel com brometo de etídio (0,5 mg/mL) (SAMBROOK; RUSSEL, 2001) e foto documentadas em sistema de captura de imagem ChemiImager™ 4400 (v5.5) (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA, EUA). Como referência foi utilizado um marcador de tamanho de pares de base de DNA 100 bp (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA).

3.6.1 Ensaios de RFLP

Os genótipos dos SNPs *TLR2* Arg753Gln, *TLR4* Thr399Ile e *IL-6* -174G>C foram identificados pela RFLP. Os produtos da PCR foram digeridos com enzimas de restrição, específicas. A digestão dos produtos da PCR do gene do *TLR2* polimorfismo Arg753Gln foi realizada com 20 U da enzima de restrição PstI (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA), a 37°C por 2 horas e gene do *TLR4* dos polimorfismo Thr399Ile e do gene da *IL-6* polimorfismo -174G>C foram realizadas com 10 U da enzima de restrição HincII *e Nla III* (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA), a 37ºC, por 1 hora e 4 horas, respectivamente. No **Quadro 2** são apresentados os tamanhos dos fragmentos gerados pela restrição para os SNPs descritos.

Os produtos de digestão enzimática foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% em SB, corados com brometo de etídeo e visualizados sob luz UV com um transluminador. As eletroforeses foram realizadas com a fonte modelo EPS 200 (GE Healthcare, Amersham Biosciences do Brasil, São Paulo, SP) 240v, 125mA por 30

minutos, utilizando-se como referência um marcador de pares de base de DNA de 50bp (SAMBROOK & RUSSEL, 2001).

Quadro 2 – Fragmentos dos produtos de restrição

Polimorfismo	Homozigoto comum	Heterozigoto	Homozigoto polimórfico	Produto da PCR íntegro
Arg753Gln	25*/304bp	25*/45*/259/304bp	25*/45*/259bp	329 bp
Thr399Ile	29*/270bp	29*/270/299bp	299bp	299bp
-174G>C	164/62bp	53*/111/62/164bp	53*/111/62bp	226bp

*** fragmento não visualizado**

3.7 Genotipagem do *TLR4* (Asp299Gly) e *TNF-α* pela técnica de HRM

Foram genotipados os polimorfismos Asp299Gly do gene *TLR4 e* -308G>A do gene *TNF-α*, empregando-se a técnica de High Resolution Melting (HRM).

Os iniciadores utilizados foram selecionados com auxílio do programa Primer Premier® v. 5.0 (Premier Biosoft International, EUA), de acordo a seqüência disponível [número de acesso NM_138554 (*TLR4) e* NM_000594.2 (TNF-α)] no Banco de genes (*GenBank*) do *National Institute of Health* (NIH) (www.ncbi.nlm.nih.gov). No **Quadro 3**, estão descritos os iniciadores utilizados no HRM para os polimorfismos estudados.

Foram utilizados 1X dos iniciadores (Invitrogen, MD, EUA) e AmpliTaq Gold® PCR Master Mix (Applied Biosystems Foster City, CA, EUA), 1,5µM do fluoróforo SYTO 9 (Applied Biosystems Foster City, CA, EUA) e 20ng de DNA genômico em um volume total de 20µL.

Quadro 3 – Iniciadores utilizados no HRM

Polimorfismos	PRIMERS (5' – 3')
TLR4	
Asp299Gly	5' CCTTTCCAGCAACAAGATTCA 3'
	5' AAAGTGATTTTGGGACAACCA 3'
TNF-α	
-308 G>A	5' CTCTCCCTCAAGGACTCAGC 3'
	5' CAGTTGTTGGCACACCCAG 3'

3.8 Extração e Análise do RNA Total

3.8.1 Extração de RNA Total de Leucócitos Totais de Sangue Periférico

O RNA de leucócitos totais foi obtido a partir de sangue total periférico, colhido com EDTA, utilizando o kit de extração *QiAamp RNA Blood Mini*® (Qiagen, Alemanha) imediatamente após a colheita do sangue. Este método que utiliza o sistema de colunas contendo membrana sílica gel que o RNA se liga e são lavados e eluidos por centrifugação. O procedimento para extração seguiu-se o protocolo fornecido pelo fabricante (*QIAamp RNA Blood Mini Handbook*). O material obtido foi armazenado no freezer - 80°C até a sua análise.

3.8.2 Análise do RNA Total

O RNA total extraído foi quantificado por espectrofotometria, utilizando o espectrofotometro Nanodrop modelo ND-100 (NanoDropTechnologies, Wilmington,

Delaware, USA). O grau de pureza do RNA foi determinado pela relação A260nm/A280nm (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

A integridade do RNA total extraído foi avaliada através do Kit RNA 6000 Nano series II (Agilent Technologies Inc., Miami, EUA) em sistema de eletroforese em chip da Bioanalyzer mod.2100 (Agilent Technologies Inc., Miami, EUA). Apenas as amostras com RIN > 7 (do inglês Number of Integrated of RNA) foram utilizadas.

3.9 Análise da Expressão de mRNA pela PCR em Tempo Real

A quantificação da expressão de mRNA dos genes *TLR2, TLR4, IL-6* e *TNF-α* em LTSP foi realizada por transcrição reversa do mRNA seguida da PCR em tempo real, utilizando o sistema de amplificação *TaqMan Two Step RT-PCR* (Applied Biosystems, Foster City, CA).

A síntese de cDNA foi a partir de 200 ng de RNA total, na presença de 200 ng de iniciadores aleatórios (*random primers*) (Invitrogen, MD, EUA), DTT 20 mM (Invitrogen, MD, EUA), 200 µM dNTP 10 mM (GE Healthcare, Amersham Biosciences do Brasil, São Paulo, SP), 200 U de transcriptase reversa (SuperScript™ II RT RNase H-) e tampão da RT (Tris-HCl 250mM pH 8,3, KCl 375 mM, $MgCl_2$ 15mM) (Invitrogen-Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). A mistura foi incubada por 10 min a 25ºC, seguida de 50 min a 42ºC e 15min a 70ºC. O cDNA obtido foi armazenado a –20ºC até a realização da PCR em tempo real.

Os iniciadores e sondas marcadas com fluoróforo *TAMRA* para todos os genes foram selecionados com o auxílio do programa Primer Express® (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) **(Quadro 3)**, de acordo com a seqüência disponível [número de

acesso NM NM_003264 (*TLR2*), NM_138554 (*TLR4*), NM_000600 (*IL-6*), NM_000594 (*TNF-α*) e NM 002046 (*GAPD*)] no Banco de genes (*GenBank*) do *National Institute of Health* (NIH) (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Quadro 3. Iniciadores e sondas utilizados nas PCR em Tempo Real

Genes	Iniciadores e Sondas
TLR2	5' CCCTGGGCAGTCTTGAACATT 3'
	5' CCCTAGGGTTTTGTAAGGATTTCC 3'
	5' TAMRA TTTATCGTCTTCCTGGTTCAAGCCCCTTTC 3'
TLR4	5' AGCGAGCCAGCATTCAC 3'
	5' GCCATGGCTGGGATCAGA 3'
	5' TAMRA ATGTCTGCCTCGCGCCTGGC 3'
IL-6	5' CGGGAACGAAAGAGAAGCTCTA 3'
	5' GGCGCTTGTGGAGAAGGA 3'
	5' TAMRA CGCCTCCAGGAGCCCAGCTATGA 3'
TNF-α	5' CCTGCCCCAATCCCTTTATT 3'
	5' CCAATTCTCTTTTTGAGCCAGAA 3'
	5' TAMRA CCCCCTCCTTCAGACACCCTCAACC 3'
GAPD	5' GGAAGGTGAAGGTCGGAGTCA 3'
	5' CTGGAAGATGGTGATGGGATTTC 3'
	5' TAMRA TCAGCCTTGAGGGTGC 3'

O programa da PCR em tempo real foi constituído de: (1) um ciclo de 20 seg a 95ºC, (ativação da enzima); (2) 40 ciclos de 3 seg a 95ºC, (melt) e (3) 30 seg a 60ºC (hibridização e extensão).

Os sinais de fluorescência emitidos pelos fluoróforos das sondas TaqMan foram detectados pelo equipamento ABI 7500 Fast (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Os dados foram analisados utilizando-se o programa 7500 System SDS Software (Applied Biosystems, Foster City, CA EUA) pelas curvas semi logarítmicas dos sinais de amplificação. Esse programa fornece o parâmetro ciclo em que o sinal de fluorescência é significativo, denominado ciclo *treshold* (C_t) (BUSTIN, 2000; LIVAK & SCHMITTGEN, 2001). Para cada amostra de cDNA, o Ct de cada gene é registrado e comparado com o do gene da gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase (*GAPDH*) que é utilizado como controle endógeno.

A quantidade de cDNA utilizada nos ensaios foi otimizada a partir de curva-padrão que permite avaliar a linearidade da amplificação bem como a eficiência da mesma. Para essa finalidade, foram utilizadas diluições seriadas (1, 1:2, 1:4 e 1:8) de cDNA de amostras usadas para a PCR em tempo real. As diluições de cDNA e os respectivos valores de Ct foram colocados em gráfico que permite verificar a relação entre essas duas variáveis (Ct x log da diluição de cDNA). Após otimização, as concentrações de sondas escolhidas foram de 250 nM para os genes *TLR2, IL-6, TNF-α* e *GAPD,* e de 300nM para o gene *TLR4,* e a concentração dos iniciadores foram de 200 nM para os genes *TLR2* e *GAPDH*, de 600 nM para o gene *IL-6* e de 900 nM para os genes *TLR4* e *TNF-α*.

A eficiência da reação foi calculada de acordo com a inclinação da curva gerada pela seguinte fórmula: $\mathbf{E = 10^{-1/\alpha} - 1 \times 100}$, onde α indica a inclinação da curva (PFAFFL,

2001). Segundo LIVAK e SCHMITTGEN, 2001, para a PCR em tempo real ter alta eficiência (90% a 100%), a inclinação (*slope*) da curva-padrão deve ser próximo de -3,3. Na **Tabela 1** são apresentados os resultados de inclinações (*slopes*) das curvas e as respectivas eficiências das PCRs, para os genes *TLR2, TLR4, IL-6, TNF-α e GAPD.*

Tabela 1. Valores de inclinação da curva e eficiência das RT-PCR em tempo real

Gene	Inclinação da curva	Eficiência
TLR2	-3,39	100%
TLR4	-3,29	100%
IL-6	-3,20	100%
TNF-α	-3,21	100%
GAPDH	-3,56	90,7%

Os valores de Ct obtidos nesses ensaios foram utilizados para o calculo da expressão relativa de mRNA de cada gene alvo em relação à do *GAPD* (controle endógeno). Essa relação é denominada Delta Ct (ΔCt) e é calculada pela fórmula: $\Delta Ct = (Ct_{\text{gene alvo}} - Ct_{\text{controle endógeno}})$

Os dados de ΔCt foram transformados em escala logarítmica (2ΔCt) para analisar os dados de expressão.

3.10 Análise Estatística

Para avaliar as diferenças de freqüências das variáveis qualitativas como obesidade e sexo foi realizado o Teste Qui-Quadrado de Pearson ou, no caso de frequências inferiores a 5 indivíduos em alguma categoria, foi utilizado o Teste Exato de Fisher o nível de significância considerado foi $p<0,05$.

Para comparar os valores de parâmetros bioquímicos entre os grupos estudados foram utilizados o *Teste t* de *Student* ou, no caso de não ajuste à distribuição normal, foi utilizado o Teste de Mann-Whitney.

As freqüências alélicas e genotípicas foram comparadas por Teste Qui-Quadrado de Pearson ou Teste Exato de Fisher. A diferença entre os parâmetros bioquímicos para os diferentes genótipos foi verificada por teste t de Student.

Os valores de expressão foram transformados em log para facilitar a interpretação. A comparação entre os grupos estudados foi realizada pelo Teste t de Student ou Teste de Mann-Whitney, e para comparar os valores de expressão gênica entre os genes foi utilizada Análise de Variância com um único fator - ANOVA.

Testes de Correlação de Pearson ou de Spearman, quando os dados não apresentaram ajuste à distribuição normal, foram utilizados para verificar a existência de associação dos parâmetros bioquímicos entre si e com a variação de expressão dos genes.

Para avaliar a influência dos polimorfismos Arg753Gln, Thr399Ile e Asp299Gly, -174C>G e -308G>A na expressão gênica do *TLR2, TLR4, IL-6 e TNF-α* respectivamente, foram utilizados o Teste *t* de Student ou Mann-Whitney.

Foram ajustados dois modelos de regressão logística um deles considerando DM2 como variável dependente e outro considerando aterosclerose como variável dependente, as variáveis independentes consideradas foram as características biodemograficas e parâmetros bioquímicos.

Os resultados foram analisados através dos *softwares Sigma Stat* versão 3.5 (SPSS Inc., Chicago, EUA) e SPSS versão 12.0. Foi considerado um nível de significância de 0,05 (α = 5%).

4. RESULTADOS

Foram analisados os dados de 61 indivíduos com diabetes melito tipo 2 (DM2) e 39 normoglicêmicos. Dentro desse grupo de indivíduos foram analisados os dados de 23 indivíduos com aterosclerose e 34 sem aterosclerose. Por fim dentro do grupo de indivíduos DM2 e RI foram analisados os dados de 21 indivíduos com aterosclerose e 13 indivíduos sem aterosclerose.

4.1 Resultados dos grupos de diabéticos e controle

4.1.1 Dados biodemográficos

As características clínicas e os valores médios dos parâmetros bioquímicos dos indivíduos diabéticos (n=61) e controle (n=39) estão apresentados na **Tabela 2.** No grupo diabéticos observou-se maior freqüência de homens, 65,6% dos casos e no grupo controle houve maior freqüência de mulheres (66,7%) (p=0,004). A média de idade dos indivíduos foi maior entre os diabéticos que entre os normoglicêmicos (p=0,005). No sexo feminino foi maior o número de menopausadas no grupo diabéticos (100%) que no grupo controle (42,8%) (p=0,030)

As concentrações séricas de glicemia, glicemia 120 min após sobrecarga de glicose, HbA1c e índice HOMA-IR foram maiores no grupo diabéticos que no grupo controle (p<0,001), o valor da insulina também se apresentou maior em indivíduos diabéticos que nos controles (p=0,015). A concentração de HDL-C foi maior no grupo controle que no grupo diabéticos (p=0,004). Os demais parâmetros não apresentaram diferenças significativas (p>0,05).

Tabela 2. Características biodemográficas e valores de exames bioquímicos dos indivíduos diabéticos e controle.

Parâmetro	Diabéticos (61)	Controle (39)	*P*
Gênero Masculino (%)	65,6% (40)	33,3% (13)	0,004[a]
Gênero Feminino (%)	34,4% (21)	66,7% (26)	
Obesidade (%)*	44,3% (27)	41% (16)	0,199[a]
IMC (kg/m2)	30,2±4,0	29,8±6,0	0,366[c]
Idade (anos)	60,6±8,7	54,8±10,9	0,005[b]
Hipertensão (%)	41% (25)	41% (16)	0,867[a]
Menopausa (%)	100% (17)	42,8 % (18)	0,030 [d]
Glicemia (mg/dL)	131,8±31,1	86,6±12,8	<0,001[c]
Glicemia 120 min após 75g de glicose (mg/dL)	207±64,8	103,5±25,7	<0,001[c]
Hb1Ac (%)	7,0±2,0	5,8±0,5	<0,001[c]
Insulina (uUI/mL)	12,3±8,7	9,4±8,7	0,015[c]
Índice HOMA-IR (%)	3,7±2,7	2,2±1,8	<0,001[c]
Índice HOMA-beta (%)	34,7±26,0	36,2±31,2	0,476 [c]
Perfil lipídico (mg/dL)			
Colesterol total	192,6±40,7	193,8 ±36,2	0,501 [b]
Triglicérides	142,5±65,6	138,3±58,4	0,972 [c]
HDL-C	40,6±9,7	46,9±11,9	0,004[c]
LDL-C	114,4±31,4	117,9±35,7	0,406 [b]
VLDL-C	29,8±13,6	27,3±12,0	0,456 [c]
Fibrinogênio (mg/dL)	353,1±84,5	362,9±97,6	0,675 [b]
PCR (mg/dL)	2,7±2,7	3,8±2,3	0,110 [c]
IL-6 (pg/mL)	6,7±10,8	5,0±3,4	0,685 [c]
TNF-α (pg/mL)	6,5±4,2	6,6±2,7	0,406 [c]

Nota: Número de indivíduos em parêntesis. DM2: diabéticos tipo 2; IMC: Índice de massa corpórea; Hb1Ac: hemoglobina glicada; HOMA-IR: *Homeostasis model assessment* (resistência à insulina); HOMA-beta: (função secretora da célula beta-pancreática); HDL-C: colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-C: colesterol da lipoproteína de baixa densidade; VLDL-C: colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade, PCR: proteína C-reativa, IL-6: interleucina-6, TNF-α: fator de necrose tumoral. As variáveis categóricas foram comparadas por Qui-quadrado(a) ou Teste exato de Fisher (d). As variáveis contínuas são apresentadas como média ± DP e comparadas por Teste-t de student(b) ou Mann-Whitney(c). *Obesidade considerada quando IMC>30 kg/m2.

Foram selecionadas variáveis que pareciam ter influencia no DM2 pelos métodos individuais (p<0,05) para realizar a regressão logística, esses dados estão apresentados na **Tabela 3.**

O gênero masculino, o índice HOMA-IR, o HDL e a insulina continuaram sendo significativos para o grupo diabéticos após a regressão logística.

Tabela 3. Características biodemográficas e exames bioquímicos dos indivíduos diabéticos após regressão logística.

Variáveis	Odds ratio	*P*
Idade (anos)	0,946	0,116
Gênero Masculino (%)	5,038	0,021
Glicemia 120 min após 75g de glicose (mg/dL)	0,991	0,080
HOMA-IR (%)	0,217	0,016
Hb1Ac (%)	1,063	0,753
HDL-C (mg/dL)	1,069	0,036
Insulina (uUI/mL)	1,481	0,041

Nota: HOMA-IR: *Homeostasis model assessment* (resistência à insulina); Hb1Ac: hemoglobina glicada; HDL-C: colesterol da lipoproteína de alta densidade.

4.1.2 Análise dos polimorfismos Arg753Gln, Thr399Ile e -174G>C

Nas **figuras 2, 3 e 4**, são demonstrados os produtos da PCR, para os polimorfismos Arg753Gln, Thr399Ile e -174G>C, respectivamente.

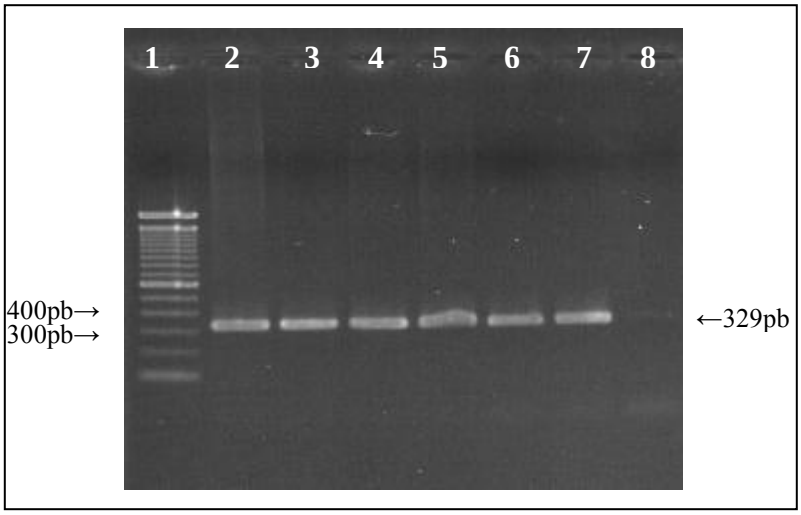


Figura 2. Fotografia do gel de eletroforese em agarose a 1% de produtos da PCR do SNP *TLR2* Arg753Gln. Linha 1: marcador de pares de base de DNA de 100bp. Linha 2 a 7: produtos da PCR. Linha 8: controle dos reagentes da PCR.

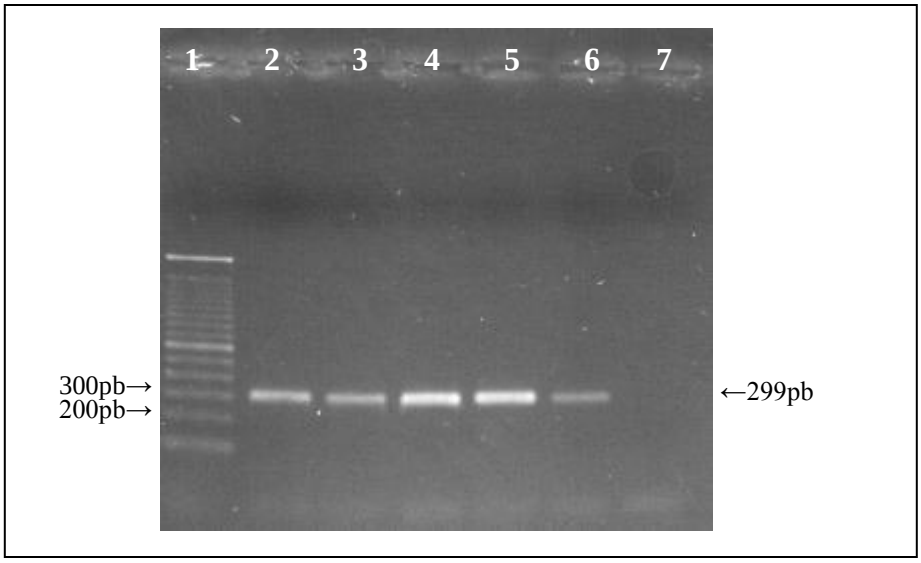


Figura 3. Fotografia do gel de eletroforese em agarose a 1% de produtos da PCR do SNP *TLR4* Thr399Ile. Linha 1: marcador de pares de base de DNA de 100bp. Linha 2 a 6: produtos da PCR. Linha 7: controle dos reagentes da PCR.

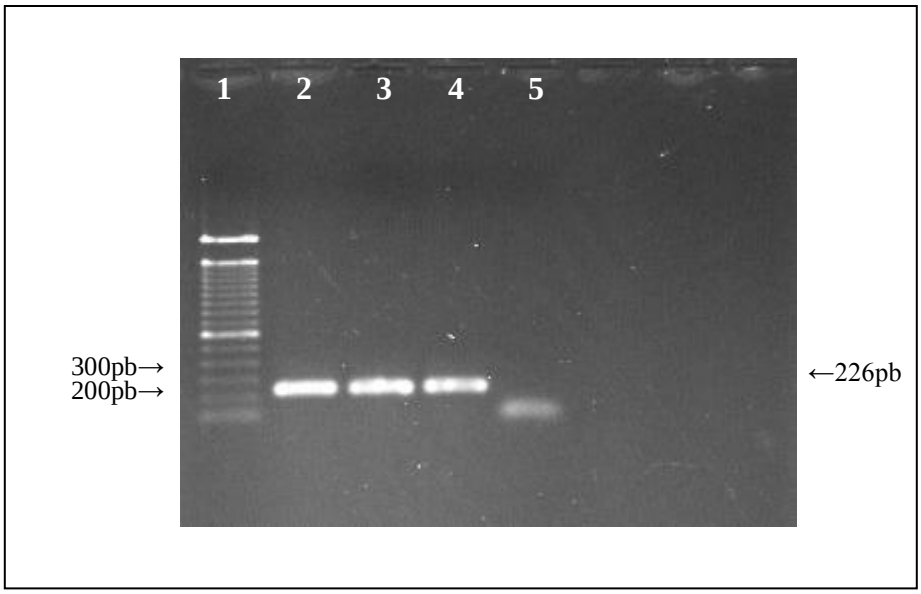


Figura 4. Fotografia do gel de eletroforese em agarose a 1% de produtos da PCR do SNP *IL-6* -174G>C. Linha 1: marcador de pares de base de DNA de 100bp. Linha 2 a 4: produtos da PCR. Linha 5: controle dos reagentes da PCR.

Após a PCR, os genótipos dos SNPs *TLR2* Arg753Gln, *TLR4* Thr399Ile e *IL-6* -174G>C foram identificados pela RFLP. Os produtos da PCR foram digeridos com enzimas de restrição, específicas para análise de cada polimorfismo (**Figuras 5, 6, 7**), respectivamente.

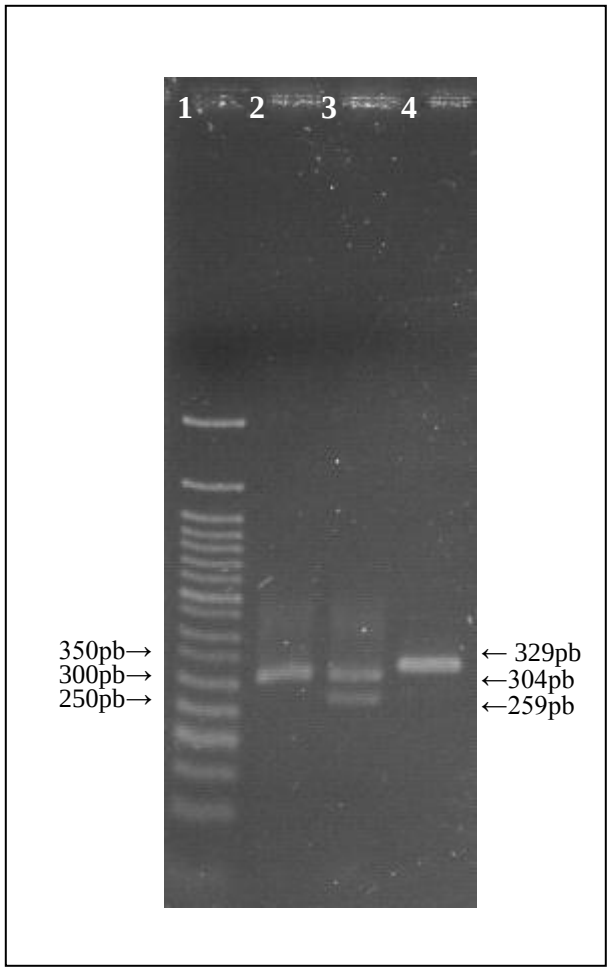


Figura 5. Fotografia do gel de eletroforese em agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo, dos produtos de restrição do SNP *TLR2* Arg753Gln Linha 1: marcador de tamanho de pares de bases de DNA de 50 bp. Linha 2: genótipo GG. Linha 3: genótipo GA. Linha 4: produto de PCR integro. Fragmentos que indicam genótipo AA não foram apresentados nesta figura, pois até esse momento este genótipo não foi encontrado nos indivíduos do estudo.

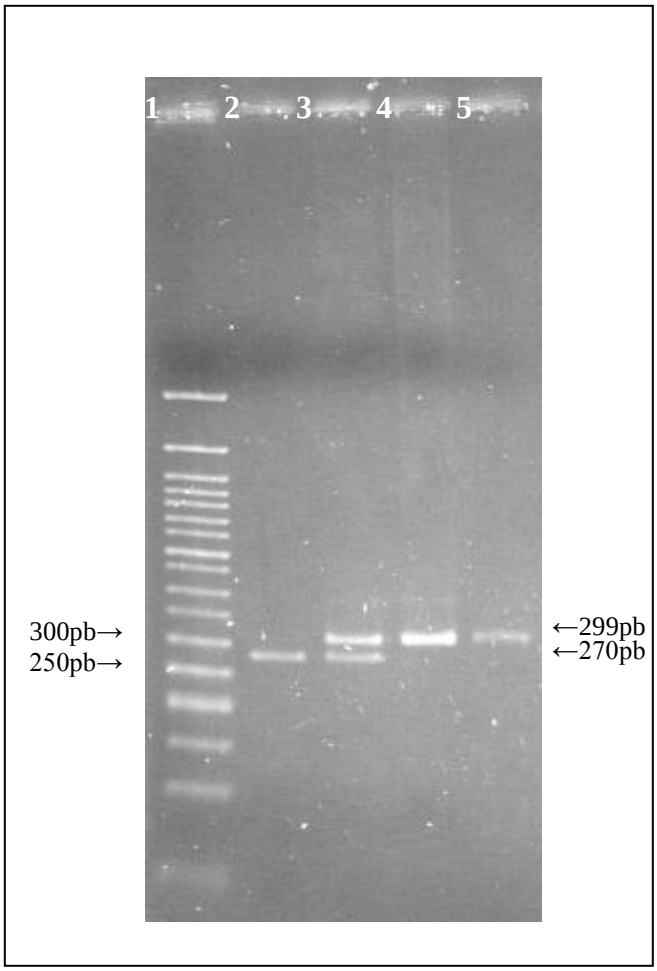


Figura 6. Fotografia do gel de eletroforese em agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo, dos produtos de restrição do SNP *TLR4* Thr399Ile Linha 1: marcador de tamanho de pares de bases de DNA de 50 bp. Linha 2: genótipo CC. Linha 3: genótipo CT. Linha 4: genótipo TT. Linha 5: produto de PCR integro.

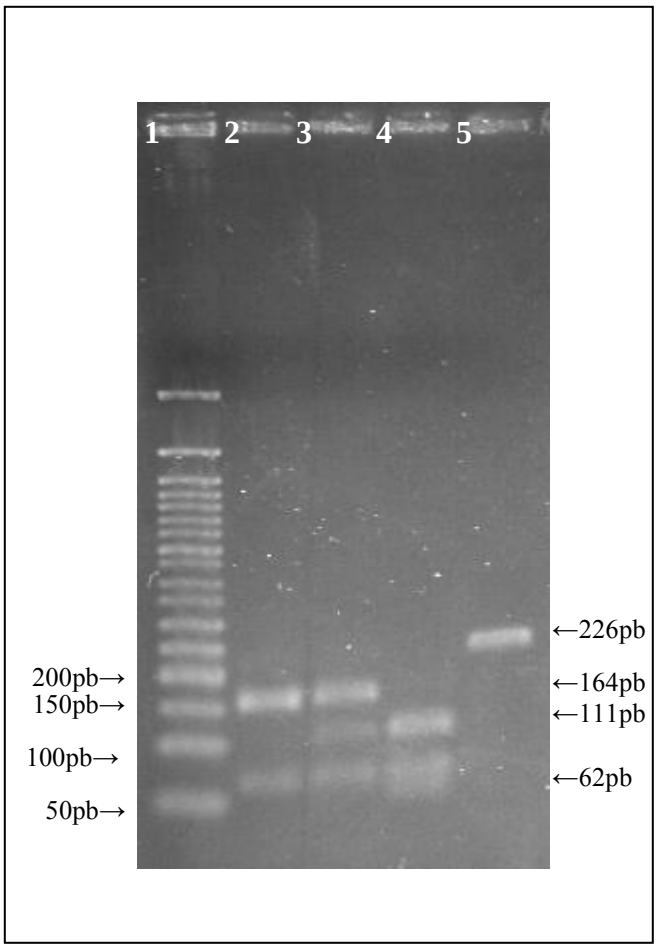


Figura 7. Fotografia do gel de eletroforese em agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo, dos produtos de restrição do SNP *IL-6* -174G>C Linha 1: marcador de tamanho de pares de bases de DNA de 50 bp. Linha 2: genótipo GG. Linha 3: genótipo GC. Linha 4: genótipo CC. Linha 5: produto de PCR integro.

4.1.3 Análise dos polimorfismos Asp299Gly e -308G>A

Os polimorfismos Asp299Gly e -308G>A foram analisados por meio da técnica de HRM, como descrito anteriormente. Nas **figuras 8 e 9**, são demonstrados os perfis obtidos das curvas de desnaturação na técnica de HRM para os polimorfismos Asp299Gly e -308G>A, respectivamente.

Figura 8. Perfis obtidos das curvas de desnaturação na HRM para o polimorfismo do gene TLR4 Asp299Gly

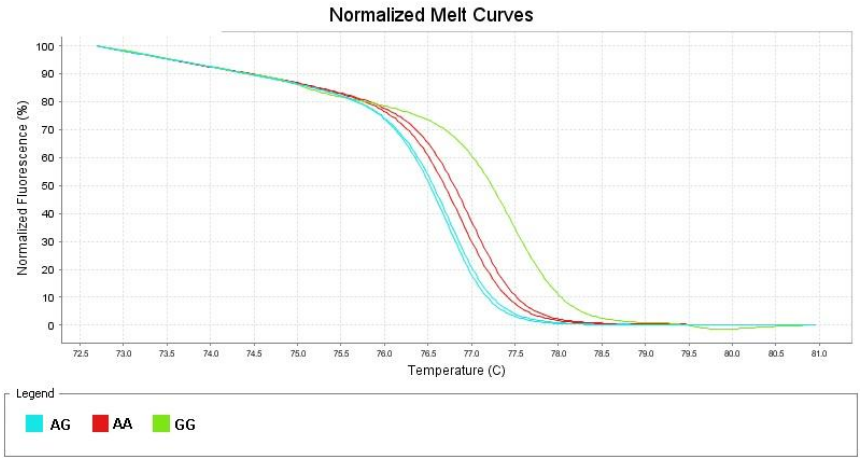
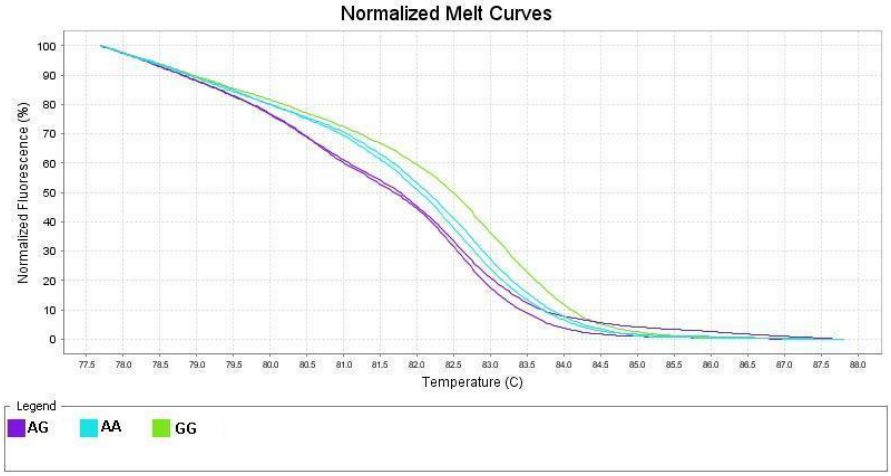


Figura 9. Perfis obtidos das curvas de desnaturação na HRM para o polimorfismo TNF-α, -308G>A



A distribuição de genótipos e a freqüência relativa de alelos para os polimorfismos Arg753Gln, Thr399Ile, -174G>C, Asp299Gly e -308G>A no grupo diabéticos e controle estão respectivamente apresentadas nas **Tabelas 4, 5, 6, 7 e 8.**

Tabela 4. Freqüências genotípicas e alélicas do polimorfismo Arg753Gln do gene TLR2 em indivíduos diabéticos e controle.

Grupos	Genótipos			Alelos	
	GG	GA	AA	G	A
diabéticos	98,2%	1,6%	0%	99,2%	0,8%
(61)	(60)	(1)	(0)		
Controle	97,4%	2,6%	0%	98,7 %	1,3%
(39)	(38)	(1)	(0)		
	χ^2= 6,000 (4 gl, *p=0,199*)			* *p*=1,000	
Total	98%	2 %	0%	99 %	1 %
(100)	(98)	(2)	(0)		
EHW	χ^2=0,01	(*p<0,05*)			

Nota: número de indivíduos entre parêntesis. ***** Teste exato de Fisher. EHW: equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 5. Freqüências genotípicas e alélicas do polimorfismo Thr399Ile do gene TLR4 em indivíduos diabéticos e controle.

Grupos	Genótipos			Alelos	
	CC	CT	TT	C	T
diabeticos	93,5%	4,9%	1,6%	95,9%	4,1%
(61)	(57)	(3)	(1)		
Controle	94,9%	5,1%	0%	97,4 %	2,6%
(39)	(37)	(2)	(0)		
	χ^2= 6,000 (4 gl, *p=0,199*)			**p*=1,000	
Total	94%	5 %	1%	96,5 %	3,5%
(100)	(94)	(5)	(1)		
EHW	χ^2=3,22	(*p<0,05*)			

Nota: número de indivíduos entre parêntesis. * Teste exato de Fisher. EHW: equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 6. Freqüências genotípicas e alélicas do polimorfismo -174G>C do gene IL-6 em indivíduos diabéticos e controle.

Grupos	Genótipos			Alelos	
	GG	GC	CC	G	C
diabeticos (61)	45,9% (28)	41% (25)	13,1% (8)	66,4%	33,6%
Controle (39)	59% (23)	23,1% (9)	17,9% (7)	70,5%	29,5%
	χ^2= 6,000 (4 gl, *p=0,199*)			*p=1,000	
Total (100)	51% (51)	34% (34)	15% (15)	68%	32%
EHW	χ^2=15,96	(*p>0,05*)			

Nota: número de indivíduos entre parêntesis. * Teste exato de Fisher. EHW: equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 7. Freqüências genotípicas e alélicas do polimorfismo Asp299Gly do gene TLR4 em indivíduos diabeticos e controle.

Grupos	Genótipos			Alelos	
	AA	AG	GG	A	G
diabeticos (61)	90,2% (55)	8,2% (5)	1,6% (1)	94,3%	5,7%
Controle (39)	92,3% (36)	5,1% (2)	2,6% (1)	94,9%	5,1%
	χ^2= 6,000 (4 gl, *p=0,199*)			*p=1,000	
Total (100)	91% (91)	7% (7)	2% (2)	94,5%	5,5%
EHW	χ^2=9,08	(*p>0,05*)			

Nota: número de indivíduos entre parêntesis. * Teste exato de Fisher. EHW: equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 8. Freqüências genotípicas e alélicas do polimorfismo -308G>A do gene TNF-α em indivíduos diabéticos e controle.

Grupos	Genótipos			Alelos	
	AA	AG	GG	A	G
diabeticos (61)	75,4% (46)	21,3% (13)	3,3% (2)	86,1%	13,9%
Controle (39)	76,9% (30)	20,5% (8)	2,6% (1)	87,2%	12,8%
	χ^2= 6,000 (4 gl, *p=0,199*)			*p=1,000	
Total (100)	66% (66)	21% (21)	3% (3)	86,5%	13,5%
EHW	χ^2=7,23	(*p>0,05*)			

Nota: número de indivíduos entre parêntesis. * Teste exato de Fisher. EHW: equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Os parâmetros antropométricos e os valores dos exames bioquímicos do grupo e controle de acordo com os genótipos dos polimorfismos Thr399Ile, -174G>C, Asp299Gly e -308G>A estão respectivamente apresentados nas **Tabelas 9, 10, 11 e 12**.

Como foi encontrado apenas um paciente que contém o alelo A do polimorfismo Arg753Gln nos indivíduos diabéticos, não pode ser feita a análise comparativa entre os genótipos.

No polimorfismo Thr399Ile e Asp299Gly nenhum parâmetro mostrou significância estatística.

Para o polimorfismo -174G>C a glicemia de jejum (p=0,048) e a glicemia 120min após sobrecarga com 75g de glicose (p= 0,017) foram maiores em pacientes com o genótipo GG que nos portadores do alelo C. Os valores de colesterol total, VLDL e

triglicérides foram maiores nos pacientes portadores do alelo C que nos pacientes com o genótipo GG (respectivamente, p=0,007, p=0,006, p=0,030).

No polimorfismo -308G>A a concentração sérica de fibrinogênio foi maior nos indivíduo portadores do alelo G que nos portadores do alelo A (p=0,020).

Tabela 9. Relação entre o polimorfismo TLR4 Thr399Ile e parâmetros antropométricos e perfil bioquímico em indivíduos diabéticos.

Variável	Total		
	Genótipos		
	CC (57)	CT+TT (4)	*P*
Glicemia jejum, mg/dL	133,2±31,7	112,2±5,2	0,083 [b]
Glicemia 120min, mg/dL	208,5±64,5	186,5±65,4	0,520 [a]
IMC, kg/m²	30,2±4,0	30,2±4,0	0,965 [b]
HOMA-IR	3,8±2,8	2,6±1,3	0,544 [b]
HOMA-Beta	34,9±26,6	31,8±12,9	0,823 [a]
CT, mg/dL	192,0±40,8	200,2±39,8	0,702 [a]
LDL-C, mg/dL	119,2±37,4	132,5±43,7	0,508 [a]
HDL-C, mg/dL	40,4±9,8	43,0±7,3	0,448 [b]
VLDL-C, mg/dL	30,1±13,9	24,7±5,8	0,600 [b]
Triglicérides, mg/dL	143,8±67,2	123,2±29,1	0,749 [b]
HbA1, %	7,1±1,9	6,2±0,2	0,451 [b]
Insulina uU/mL	12,4±8,9	10,1±4,5	0,767 [b]
Fibrinogênio, mg/dL	351,1±86,8	374,7±47,4	0,655 [a]
PCR , mg/dL	2,8±2,8	1,7±0,2	0,808 [b]
IL-6, pg/mL	6,8±11,1	6,4±3,4	0,428 [b]
TNF-α, pg/mL	6,1±2,5	12,6±11,5	0,254 [a]

Nota: Número de indivíduos em parêntesis. HDL-C: colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-C: colesterol da lipoproteína de baixa densidade; VLDL-C: colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade, IMC: Índice de massa corpórea; Hb1Ac: hemoglobina glicada; HOMA-IR: Homeostasis model assessment (resistência à insulina); HOMA--Beta: (função secretora da célula beta-pancreática), PCR: proteína C-reativa, IL-6: interleucina-6, TNF-α: fator de necrose tumoral. Os resultados apresentados como média ± desvio-padrão e comparados por teste-t de student[(a)] Mann-Whitney[(b)].*Obesidade considerada quando IMC>30 kg/m$^{2.}$

Tabela 10. Relação entre o polimorfismo IL-6 -174 G>C e parâmetros antropométricos e perfil bioquímico em indivíduos diabéticos.

Variável	Total		
	Genótipos		
	GG (28)	GC+CC (33)	*P*
Glicemia jejum, mg/dL	140,5±35,6	124,6±24,5	0,048 [b]
Glicemia 120min, mg/dL	230,2±69,7	186,8±52,3	0,017 [b]
IMC, kg/m²	30,0±3,9	30,3±4,1	0,712[b]
HOMA-IR	3,6±2,8	3,8±2,7	0,733 [b]
HOMA-Beta	31,0±27,5	37,9±24,1	0,093 [b]
CT, mg/dL	177,5±36,6	205,3±39,8	0,007 [a]
LDL-C, mg/dL	112,8±33,8	126,3±40,2	0,173 [a]
HDL-C, mg/dL	40,9±8,2	40,03±10,7	0,519 [b]
VLDL-C, mg/dL	24,8±10,7	34,0±14,4	0,006 [b]
TG, mg/dL	122,8±51,6	159,2±71,3	0,030 [b]
HbA1, %	6,6±1,0	7,2±2,3	0,707 [b]
Insulina, uU/mL	11,4±9,1	13,0±8,3	0,263 [b]
Fibrinogênio, mg/dL	348,2±89,3	357,6±79,5	0,743 [a]
PCR , mg/dL	2,7±2,6	2,8±2,8	0,526 [b]
IL-6, pg/mL	4,5±3,4	8,7±14,2	0,209 [b]
TNF-α,, pg/mL	6,4±5,3	6,6±2,7	0,208 [a]

Nota: Número de indivíduos em parêntesis. HDL-C: colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-C: colesterol da lipoproteína de baixa densidade; VLDL-C: colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade, IMC: Índice de massa corpórea; Hb1Ac: hemoglobina glicada; HOMA-IR: Homeostasis model assessment (resistência à insulina); HOMA--Beta: (função secretora da célula beta-pancreática), PCR: proteína C-reativa, IL-6: interleucina-6, TNF-α: fator de necrose tumoral. Os resultados apresentados como média ± desvio-padrão e comparados por teste-t de student[(a)] Mann-Whitney[(b)].*Obesidade considerada quando IMC>30 kg/m$^{2.}$

Tabela 11. Relação entre o polimorfismo TLR4 Asp299Gly e parâmetros antropométricos e perfil bioquímico em indivíduos diabéticos

Variável	Total		
	Genótipos		
	AA (55)	AG+GG (6)	*P*
Glicemia jejum, mg/dL	132,6±32,6	125,2±8,0	0,680 [b]
Glicemia 120min, mg/dL	205,5±66,9	219,8±39,8	0,616 [a]
IMC, kg/m²	30,2±4,0	30,1±4,1	0,932 [b]
HOMA-IR	3,7±2,7	3,6±2,9	0,703 [b]
HOMA-Beta	34,3±26,6	37,7±19,7	0,767 [a]
CT, mg/dL	192,0±40,5	197,8±42,4	0,743 [a]
LDL-C, mg/dL	119,7±38,4	123,0±34,0	0,821 [a]
HDL-C, mg/dL	40,0±9,5	45,8±9,7	0,149 [b]
VLDL-C, mg/dL	29,9±13,8	28,5±11,0	0,904 [b]
Triglicérides, mg/dL	142,5±66,7	142,3±54,6	0,932 [b]
HbA1, %	6,9±2,0	7,1±1,2	0,531 [b]
Insulina uU/mL	12,3±8,8	12,1±8,2	0,815 [b]
Fibrinogênio, mg/dL	351,7±87,1	368,0±43,7	0,758 [a]
PCR , mg/dL	2,5±2,5	4,3±3,7	0,313 [b]
IL-6, pg/mL	7,0±11,3	4,37±2,4	0,595 [b]
TNF-α, pg/mL	6,7±4,3	4,6±1,0	0,115 [b]

Nota: Número de indivíduos em parêntesis. HDL-C: colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-C: colesterol da lipoproteína de baixa densidade; VLDL-C: colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade, IMC: Índice de massa corpórea; Hb1Ac: hemoglobina glicada; HOMA-IR: Homeostasis model assessment (resistência à insulina); HOMA--Beta: (função secretora da célula beta-pancreática), PCR: proteína C-reativa, IL-6: interleucina-6, TNF-α: fator de necrose tumoral. Os resultados apresentados como média ± desvio-padrão e comparados por teste-t de student[(a)] Mann-Whitney[(b)].*Obesidade considerada quando IMC>30 kg/m$^{2.}$

Tabela 12. Relação entre o polimorfismo TNF -308G>A e parâmetros antropométricos e perfil bioquímico em indivíduos diabéticos.

Variável	Total		
	Genótipos		
	GG (46)	GA+AA (15)	*P*
Glicemia jejum, mg/dL	131,2±31,4	133,9±30,3	0,725 [b]
Glicemia 120min, mg/dL	208,1±68,3	203,6±51,7	0,828 [a]
IMC, kg/m²	30,0±3,4	30,6±5,3	0,887 [b]
HOMA-IR	3,5±2,2	4,2±4,0	0,946 [b]
HOMA-Beta	33,9±21,3	36,9±36,4	0,704 [a]
CT, mg/dL	192,1±43,8	193,9±29,5	0,888 [a]
LDL-C, mg/dL	122,6±37,4	112,4±38,8	0,372 [a]
HDL-C, mg/dL	41,0±10,1	39,3±8,0	0,801 [b]
VLDL-C, mg/dL	29,7±14,0	30,1±12,2	0,712 [b]
Triglicérides, mg/dL	140,0±66,8	150,4±61,0	0,431 [b]
HbA1, %	7,0±1,8	6,7±2,2	0,188 [b]
Insulina uU/mL	11,7±7,0	13,9±12,5	0,918 [b]
Fibrinogênio, mg/dL	371,3±85,2	296,2±50,1	0,020 [a]
PCR , mg/dL	2,7±2,6	2,8±2,9	0,737 [b]
IL-6, pg/mL	5,6±6,2	9,9±18,2	0,972 [a]
TNF-α, pg/mL	7,0±4,6	5,2±1,9	0,094 [a]

Nota: Número de indivíduos em parêntesis. HDL-C: colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-C: colesterol da lipoproteína de baixa densidade; VLDL-C: colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade, IMC: Índice de massa corpórea; Hb1Ac: hemoglobina glicada; HOMA-IR: Homeostasis model assessment (resistência à insulina); HOMA--Beta: (função secretora da célula beta-pancreática), PCR: proteína C-reativa, IL-6: interleucina-6, TNF-α: fator de necrose tumoral. Os resultados apresentados como média ± desvio-padrão e comparados por teste-t de student[(a)] Mann-Whitney[(b)].*Obesidade considerada quando IMC>30 kg/m$^{2.}$

4.1.4 Resultados da expressão gênica

As expressões genes TLR2, TLR4, IL-6 e TNF-α em leucócitos totais do sangue periférico (LTSP) foram analisadas em indivíduos do grupo diabéticos e controle.

Os valores de Ct obtidos nesses ensaios foram utilizados para o cálculo da expressão relativa de mRNA de cada gene alvo em relação à do *GAPD* (controle endógeno). Essa relação é denominada Delta Ct (ΔCt). Os dados de ΔCt foram transformados em escala logarítmica (2ΔCt) para comparar dados de expressão.

Na **tabela 13** são apresentados os valores medianos e intervalos (25% - 75%) de expressão do mRNA dos genes TLR2, TLR4, IL-6 E TNF-α em LTSP no grupo diabéticos e grupo controle. Observou-se que a expressão de *TLR4* no grupo diabéticos está aumentada em comparação ao grupo controle ($p<0,05$). Para demais genes não houve diferenças estatisticamente significantes entre o grupo diabéticos e o grupo controle. Contudo, observou-se expressão aumentada de *TLR2* em relação aos outros genes, tanto no grupo diabéticos, como no grupo controle.

Tabela 13. Valor de expressão do grupo diabéticos de *TLR2, TLR4, IL-6 e TNF-α* comparados aos valores do grupo controle.

Genes	**Diabéticos($2^{-\Delta Ct}$) (61)**	**Controle ($2^{-\Delta Ct}$) (39)**	P
TLR2	0,238821 (0,162569-0,345584)	0,258816 (0,209497-0,415235)	0,145[a]
TLR4	0,000970 (0,000551-0,001208)	0,000657 (0,000444-0,000855)	0,029[a]
IL-6	0,000553 (0,000308-0,000763)	0,000455 (0,000332-0,001035)	0,838[a]
TNF-α	0,018011 (0,110601-0,025898)	0,017039 (0,012577-0,022797)	0,846[a]
P	p<0,001[b]	p<0,001[b]	

Nota: Número de indivíduos em parênteses. ΔCt: CT do gene alvo – Ct GAPD da amostra. Os resultados apresentados como mediana (25%-75%) e comparados por: Mann-Whitney Rank Sun Test [(a)],One-Way ANOVA on Ranks com análise de comparação múltipla de Tukey [(b)].

A **Figura 10** ilustra a variação de expressão gênica normalizada, transformada em escala logarítmica no grupo diabéticos (caixas cinza) e controle (caixas brancas).

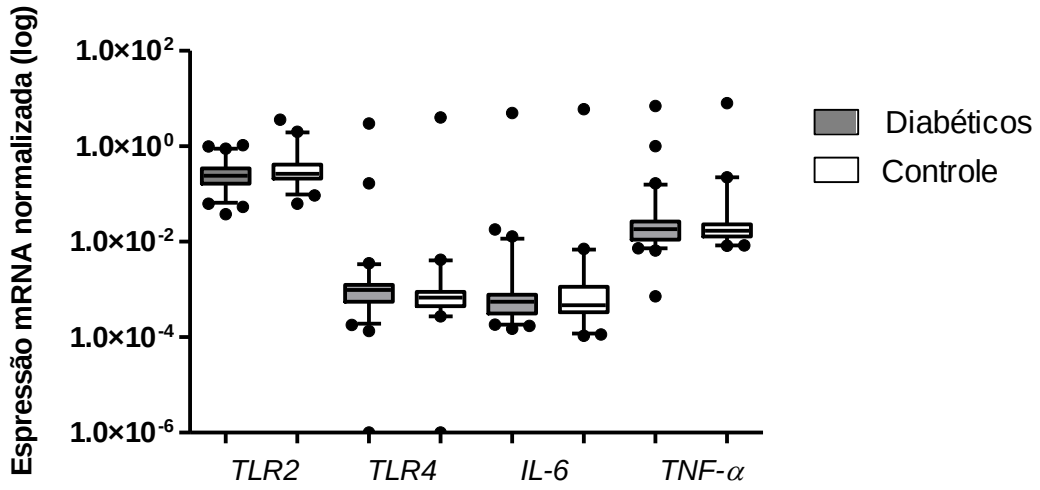


Figura 10. Box plots de valores de expressão normalizada dos genes *TLR2, TLR4, IL-6 e TNF-α*, no grupo diabéticos e no grupo controle. As caixas de representação mostram a mediana, distância interquartílica (5-95%) e os valores extremos (círculos).

A análise de correlação entre os parâmetros bioquímicos e os valores de expressão de mRNA dos genes *TLR2, TLR4, IL-6 e TNF-α* normalizados com o controle endógeno *GAPD* do grupo diabéticos está apresentada na **Tabela 14**.

Observou-se correlação negativa entre os valores de expressão de mRNA do gene TLR4 com glicemia e VLDL-C (respectivamente, rs -0,256 p=0,046 e rs -0,344 p=0,007), essas correlações estão apresentadas na **Figura 11**, nos gráficos A e B respectivamente. Não houve correlação entre a variação da expressão gênica de *TLR2, IL-6* e *TNF-α* com a variação dos parâmetros bioquímicos nos diabéticos.

Tabela 14. Análise da correlação entre expressão de *TLR2, TLR4, IL-6 e TNF-α* e os parâmetros bioquímicos em indivíduos do grupo diabéticos.

Parâmetros	*TLR2*	*TLR4*	*IL-6*	*TNF-α*
Glicemia (mg/dL)	-0,111 p=0,395	-0,256 p=0,046	-0,0693 p=0,595	-0,0574 p=0,659
Glicemia 120 min. (mg/dL)	0,171 p=0,198	0,0260 p=0,845	0,0188 p=0,888	0,00961 p=0,942
HbA1c (%)	0,105 p=0,431	0,00310 p=0,981	-0,00128 p=0,992	0,0368 p=0,783
Insulina (uUI/mL)	-0,0420 p=0,804	-0,00697 p=0,958	-0,167 p=0,202	0,128 p=0,327
IMC (Kg/m2)	0,0220 p=0,866	0,183 p=0,183	-0,00907 p=0,944	0,0782 p=0,242
Homa-IR (%)	0,0326 p=0,804	-0,0202 p=0,878	-0,138 p=0,292	0,153 p=0,242
Homa-Beta (%)	-0,0535 p=0,681	0,0194 p=0,883	-0,0807 p=0,538	0,114 p=0,386
Colesterol Total (mg/dL)	0,0535 p=0,681	-0,167 p=0,883	0,184 p=0,156	0,0342 p=0,793
LDL-C (mg/dL)	0,0237 p=0,856	-0,0298 p=0,819	0,130 p=0,315	0,0781 p=0,549
HDL-C (mg/dL)	0,0646 p=0,619	0,0159 p=0,903	-0,0263 p=0,840	-0,234 p=0,069
VLDL-C (mg/dL)	-0,178 p=0,170	-0,344 p=0,007	0,0767 p=0,555	0,0296 p=0,820
Triglicérides (mg/dL)	-0,195 p=0,132	-0,208 p=0,108	0,0622 p=0,633	0,00214 p=0,984
PCR	0,0749 p=0,662	-0,0410 p=0,811	0,170 p=0,319	0,218 p=0,199
Fibrinogênio	-0,195 p=0,245	-0,344 p=0,054	-0,0521 p=0,757	-0,195 p=0,246
IL-6	0,00156 p=0,990	0,200 p=0,128	-0,120 p=0,364	-0,0199 p=0,881
TNF-α	-0,233 p=0,074	-0,173 p=0,186	0,00589 p=0,964	-0,236 p=0,069

Nota: Números de indivíduos em parênteses. IMC: Índice de massa corpórea; HbA1c: hemoglobina glicada; HOMA-IR: *Homeostasis model assessment* (resistência à insulina); HOMA-beta: (função secretora da célula beta-pancreática); HDL-C: colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-C: colesterol da lipoproteína de baixa densidade; VLDL-C: colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade. A significância da correlação foi calculada por coeficiente de correlação de Pearson e Spearman (rs).

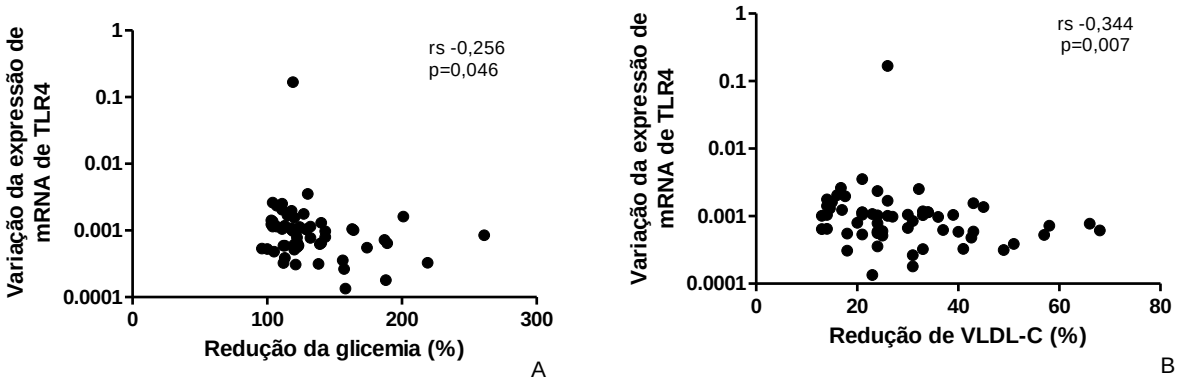


Figura 11. Análise de correlação entre as variações da expressão de mRNA do *PPARγ2 e SUR1* ($\Delta Ct_{gene\ alvo}$- ΔCt_{GAPD}) no grupo diabéticos. A: variação de *TLR4 vs* glicemia; B: variação de *TLR4 vs* VLDL-C.

4.1.5 Resultados de efeitos do polimorfismo Thr399Ile, Asp299Gly, -174 G>C e -308 G>A sobre expressão gênica do *TLR4*, *IL-6* e *TNF-α*

As expressões de mRNA do *TLR4*, *IL-6* e *TNF-α* comparadas com os polimorfismos Thr399Ile, Asp299Gly, -174G>C e -308G>A são apresentadas nas **Tabelas 15, 16, 17 e 18,** respectivamente. Foram encontradas diferenças significativas na expressão de mRNA do *TNF-α* entre os genótipos do polimorfismo -308G>A tanto no grupo diabéticos(p=0,031) quanto no grupo controle (p=0,020) o genótipo GG está relacionado com uma maior expressão do TNF-α que os genótipos GA+AA.

Tabela 15. Influência do polimorfismo Thr399Ile na expressão de mRNA do *TLR4* em indivíduos do grupo diabéticos e controle.

	CC (57)	**CT+TT (4)**	***P* (CC *vs*. AA/GG)**
Estudo *TLR4* ($2^{-\Delta Ct}$)	0,000896(0,000627-0,001569)	0,000895(0,000627-0,001569)	0,316
Controle *TLR4* ($2^{-\Delta Ct}$)	0,000657(0,000444-0,000851)	0,000680(0,000633-0,000961)	0,502

Nota: Número de indivíduos em parênteses. ΔCt: CT do gene alvo – Ct GAPD da amostra
Valores são apresentados como mediana (25%-75%) dos dados. Os resultados foram comparados por Mann-Whitney.

Tabela 16. Influência do polimorfismo Asp299Gly na expressão de mRNA do *TLR4* em indivíduos do grupo diabéticos e controle.

	AA (55)	**AG+GG (6)**	***P* (AA *vs*. AG/GG)**
Estudo *TLR4* ($2^{-\Delta Ct}$)	0,000735(0,000516-0,001075)	0,000788(0,000485-0,001491)	0,634
Controle *TLR4* ($2^{-\Delta Ct}$)	0,000652(0,000444-0,000813)	0,0008555(0,000697-0,00112)	0,197

Nota: Número de indivíduos em parênteses. ΔCt: CT do gene alvo – Ct GAPD da amostra
Valores são apresentados como mediana (25%-75%) dos dados. Os resultados foram comparados por Mann-Whitney.

Tabela 17. Influência do polimorfismo -174G>C na expressão de mRNA do *IL-6* em indivíduos do grupo diabéticos e controle.

	GG (33)	**GC+CC (28)**	***P* (GG *vs*. CG/CC)**
Estudo *IL-6* ($2^{-\Delta Ct}$)	0,000455(0,0003001-0,000735)	0,000572(0,000349-0,000948)	0,140
Controle *IL-6* ($2^{-\Delta Ct}$)	0,000443(0,000330-0,000958)	0,000521(0,000354-0,00112)	0,384

Nota: Número de indivíduos em parênteses. ΔCt: CT do gene alvo – Ct GAPD da amostra
Valores são apresentados como mediana (25%-75%) dos dados. Os resultados foram comparados por Mann-Whitney.

Tabela 18. Influência do polimorfismo -308G>A na expressão de mRNA do *TNF-α* em indivíduos do grupo diabéticos e controle.

	GG (46)	**GA+AA (15)**	***P* (GG *vs*. GA/AA)**
Estudo *TNF-α* ($2^{-\Delta Ct}$)	0,018295(0,012793-0,024468)	0,012741(0,0100844-0,022380)	0,031
Controle *TNF-α* ($2^{-\Delta Ct}$)	0,0179(0,0139-0,0234)	0,0134(0,00961-0,0149)	0,020

Nota: Número de indivíduos em parênteses. ΔCt: CT do gene alvo – Ct GAPD da amostra
Valores são apresentados como mediana (25%-75%) dos dados. Os resultados foram comparados por Mann-Whitney.

4.2 Resultados dos grupos com aterosclerose e sem aterosclerose

4.2.1 Dados biodemográficos

As características clínicas e os valores médios dos parâmetros bioquímicos dos indivíduos com aterosclerose (n=23) e sem aterosclerose (n=34) estão apresentados na **Tabela 19.**

A média de idade entre os pacientes com aterosclerose foi maior que a média de idade entre os pacientes sem aterosclerose (p=0,018). As concentrações séricas de glicemia e pós sobrecarga de glicose também foram maiores nos indivíduos com aterosclerose (respectivamente p=0,002 e 0,008) . Os demais parâmetros não apresentaram diferenças significativas entres os grupos estudados (p>0,05).

Tabela 19. Características biodemográficas e valores de exames bioquímicos do grupo com aterosclerose e sem aterosclerose

Parâmetro	Com Aterosclerose (23)	Sem Aterosclerose (34)	*P*
Gênero Masculino (%)	69,6% (16)	47,1% (16)	0,093 [a]
Gênero Feminino (%)	30,4% (7)	52,9% (18)	
Obesidade (%)*	43,5% (10)	41,2% (14)	0,199 [a]
Tabagismo (%)	27,3% (8)	41,2% (14)	0,205 [d]
IMC (kg/m2)	29,5±3,8	29,7±5,3	0,887 [b]
Idade (anos)	62,4±8,3	55,0±12,3	0,016 [b]
Hipertensão (%)	52,2% (12)	44,1% (15)	0,783 [a]
Glicemia (mg/dL)	119,3±18,7	101,1±28,7	0,002 [c]
Glicemia 120 min após 75g de glicose (mg/dL)	190,8±53,5	151,6±70,6	0,008 [c]
Hb1Ac (%)	6,8±1,8	6,1±0,8	0,097 [c]
Insulina (uUI/mL)	12,0±7,8	9,7±7,8	0,196 [c]
Índice HOMA-IR (%)	3,4±2,4	2,4±2,1	0,063 [c]
Índice HOMA-beta (%)	35,5±25,3	34,2±30,4	0,769 [c]
Perfil lipídico (mg/dL)			
Colesterol total	192,6±33,9	190,7 ±44,1	0,875 [b]
Triglicérides	143,0±67,3	146,2±72,4	0,968 [c]
HDL-C	40,3±7,7	46,4±13,1	0,179 [c]
LDL-C	121,5±33,9	113,5±39,5	0,232 [c]
VLDL-C	30,7±15,0	29,7±14,3	0,757 [c]
Fibrinogênio (mg/dL)	337,9±92,8	361,3±82,9	0,417 [c]
PCR (mg/dL)	2,5±2,3	3,4±3,6	0,922 [c]
IL-6 (pg/mL)	7,7±14,7	4,4±2,6	0,484 [c]
TNF-α (pg/mL)	7,1±5,9	7,6±2,5	0,051 [c]

Nota: Número de indivíduos em parêntesis. DM2: diabéticos tipo 2; IMC: Índice de massa corpórea; Hb1Ac: hemoglobina glicada; HOMA-IR: *Homeostasis model assessment* (resistência à insulina); HOMA-beta: (função secretora da célula beta); HDL-C: colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-C: colesterol da lipoproteína de baixa densidade; VLDL-C: colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade, PCR: proteína C-reativa, IL-6: interleucina-6, TNF-α: fator de necrose tumoral. As variáveis categóricas foram comparadas por qui-quadrado(a) ou Teste exato de Fisher (d). As variáveis contínuas são apresentadas como média ± DP e comparadas por Teste-t de student(b) ou Mann-Whitney(c). *Obesidade considerada quando IMC>30 kg/m.

Foram selecionadas variáveis que pareciam ter influencia na aterosclerose pelos métodos individuais (p<0,05) para realizar a regressão logística, esses dados estão apresentados na **Tabela 20.**

Nenhuma variável continuou sendo significativa para os indivíduos com aterosclerose após a regressão logística.

Tabela 20. Características biodemográficas e exames bioquímicos dos indivíduos com aterosclerose após regressão logística.

Variáveis	Odds ratio	*P*
Idade (anos)	1,0519	0,1131
Gênero Masculino (%)	2,7244	0,2093
Glicemia 120 min após 75g de glicose (mg/dL)	1,0017	0,7414
HDL-C (mg/dL)	0,9721	0,3620

Nota: HDL-C: colesterol da lipoproteína de alta densidade.

4.2.2 Análise dos polimorfismos Arg753Gln, Thr399Ile, -174G>C, Asp299Gly e -308G>A

A distribuição de genótipos e a freqüência relativa de alelos para os polimorfismos Arg753Gln, Thr399Ile, -174G>C, Asp299Gly e -308G>A no grupo de indivíduos com aterosclerose e sem aterosclerose estão respectivamente apresentadas nas **Tabelas 21, 22, 23, 24 e 25.**

Tabela 21. Freqüências genotípicas e alélicas do polimorfismo Arg753Gln do gene TLR2 em indivíduos com aterosclerose e sem aterosclerose.

Grupos	Genótipos			Alelos	
	GG	GA	AA	G	A
Com aterosclerose (23)	100% (23)	0% (0)	0% (0)	100%	0%
Sem aterosclerose (34)	97,2% (33)	2,8% (1)	0% (0)	98,5 %	1,5%
	χ^2= 3,000 (2 gl, *p=0,223*)			* *p=1*,000	
Total (57)	97,5% (56)	2,5 % (1)	0% (0)	98,6 %	1,4 %
EHW	χ^2=0,122	(*p<0,05*)			

Nota: número de indivíduos entre parêntesis. ***** Teste exato de Fisher. EHW: equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 22. Freqüências genotípicas e alélicas do polimorfismo Thr399Ile do gene TLR4 em indivíduos com aterosclerose e sem aterosclerose.

Grupos	Genótipos			Alelos	
	CC	CT	TT	C	T
Com aterosclerose (23)	95,2% (22)	4,8% (1)	0% (0)	97,8%	2,2%
Sem aterosclerose (34)	100% (34)	0% (0)	0% (0)	100%	0%
	χ^2= 3,000 (2 gl, *p=0,223*)			* *p*=1,000	
Total (57)	98,2% (56)	1,8% (1)	0% (0)	99,1%	0,9%
EHW	χ^2=0,734	(*p<0,05*)			

Nota: número de indivíduos entre parêntesis. ***** Teste exato de Fisher. EHW: equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 23. Freqüências genotípicas e alélicas do polimorfismo -174G>C do gene IL-6 em indivíduos com aterosclerose e sem aterosclerose.

Grupos	Genótipos			Alelos	
	GG	GC	CC	G	C
Com aterosclerose (23)	60,9% (14)	30,4% (7)	8,7% (2)	76,1%	23,9%
Sem aterosclerose (34)	41,2% (14)	38,2% (13)	20,6% (7)	60,3%	39,7%
	χ^2= 6,000 (4 gl, *p=0,199*)			**p=1*,000	
Total (57)	49,1% (28)	35,1% (20)	15.8% (9)	66,7%	33,3%
EHW	χ^2=4,984	(*p>0,05*)			

Nota: número de indivíduos entre parêntesis. ***** Teste exato de Fisher. EHW: equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 24. Freqüências genotípicas e alélicas do polimorfismo Asp299Gly do gene IL-6 em indivíduos com aterosclerose e sem aterosclerose.

Grupos	Genótipos			Alelos	
	AA	AG	GG	A	G
Com aterosclerose (23)	82,6% (19)	17,4% (4)	0% (0)	91,3%	8,6%
Sem aterosclerose (34)	97,1% (33)	2,9% (1)	0% (0)	98,5%	1,5%
	χ^2= 6,000 (4 gl, *p=0,199*)			**p=1*,000	
Total (57)	91,2% (52)	8,8% (5)	0% (0)	95,6%	4,4%
EHW	χ^2=3,583	(*p<0,05*)			

Nota: número de indivíduos entre parêntesis. ***** Teste exato de Fisher. EHW: equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 25. Freqüências genotípicas e alélicas do polimorfismo -308G>A do gene TNF-α em indivíduos com aterosclerose e sem aterosclerose.

Grupos	Genótipos			Alelos	
	GG	GA	AA	G	A
Com aterosclerose (23)	78,3% (18)	17,4% (4)	4,4% (1)	87%	13,0%
Sem aterosclerose (34)	70,6% (24)	26,5% (9)	2,9% (1)	83,8%	16,2%
	χ^2= 6,000 (4 gl, *p=0,199*)			**p=1*,000	
Total (57)	73,7 % (42)	22,8% (13)	3,5% (2)	85,1%	14,9%
EHW	χ^2=9,759	(*p>0,05*)			

Nota: número de indivíduos entre parêntesis. ***** Teste exato de Fisher. EHW: equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Os parâmetros antropométricos e os valores dos exames bioquímicos do grupo com aterosclerose de acordo com os genótipos dos polimorfismos Asp299Gly, -174G>C e -308G>A estão respectivamente apresentados nas **Tabelas 26, 27 e 28**.

Como não foi encontrado nenhum paciente que contém o alelo T do polimorfismo Thr399Ile, e apenas um paciente com o alelo A do polimorfismo Arg753Gln, no grupo de indivíduos com aterosclerose, não pode ser feita a análise comparativa entre os genótipos.

Para o polimorfismo Asp299Gly a glicemia120min após sobrecarga com 75g de glicose (p= 0,012) foi maior em indivíduos portadores do alelo G que nos indivíduos com o genótipo AA.

No polimorfismo -174G>C os valores de colesterol total e o LDL-C (ambos $p<0,001$) foram maiores nos indivíduos portadores do alelo C, que nos indivíduos com o genótipo GG.

Para o polimorfismo -308G>A não foi encontrada nenhuma diferença significativa entre os genótipos para os parâmetros analisados.

Tabela 26. Relação entre o polimorfismo Asp299Gly e parâmetros antropométricos e perfil bioquímico em indivíduos com aterosclerose.

Variável	Total		
	Genótipos		
	AA (19)	AG+GG (4)	*P*
Glicemia jejum, mg/dL	117,1±19,8	129,2±5,8	0,074 [b]
Glicemia 120min, mg/dL	178,3±51,1	247,2±9,2	0,012 [b]
IMC, kg/m²	29,3±3,6	30,8±4,5	0,480 [a]
HOMA-IR	3,2±2,1	4,6±3,2	0,303 [a]
HOMA-Beta	34,4±25,7	40,6±22,5	0,677 [a]
CT, mg/dL	190,4±37,8	203,0±51,1	0,593[a]
LDL-C, mg/dL	119,3±32,4	132,0±38,9	0,519 [a]
HDL-C, mg/dL	39,8±7,8	42,5±7,2	0,553 [a]
VLDL-C, mg/dL	31,2±15,3	28,5±13,1	0,655 [b]
TG, mg/dL	143,1±67,8	142,5±64,8	0,776 [b]
HbA1, %	6,7±1,9	7,0±1,3	0,530 [b]
Insulina, uU/mL	11,4±7,5	14,9±8,7	0,439 [a]
Fibrinogênio, mg/dL	331,4±92,7	429,0±0,8	0,233 [b]
PCR, mg/dL	2,0±1,0	6,3±4,3	0,185 [a]
IL-6, pg/mL	8,3±16,1	5,3±2,6	0,711 [b]
TNF-α,, pg/mL	7,7±6,3	4,3±1,1	0,096 [b]

Nota: Número de indivíduos em parêntesis. HDL-C: colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-C: colesterol da lipoproteína de baixa densidade; VLDL-C: colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade, IMC: Índice de massa corpórea; Hb1Ac: hemoglobina glicada; HOMA-IR: Homeostasis model assessment (resistência à insulina); HOMA--Beta: (função secretora da célula beta-pancreática), PCR: proteína C-reativa, IL-6: interleucina-6, TNF-α: fator de necrose tumoral. Os resultados apresentados como média ± desvio-padrão e comparados por teste-t de student[(a)] Mann-Whitney[(b)].*Obesidade considerada quando IMC>30 kg/m$^{2.}$

Tabela 27. Relação entre o polimorfismo *IL-6* -174 G>C e parâmetros antropométricos e perfil bioquímico em indivíduos com aterosclerose.

Variável	Total		
	Genótipos		
	GG (14)	GC+CC (9)	*P*
Glicemia jejum, mg/dL	123,0±22,1	113,4±8,8	0,251 [a]
Glicemia 120min, mg/dL	206,1±56,4	168,8±39,7	0,118 [a]
IMC, kg/m²	29,2±3,9	30,1±3,7	0,591 [a]
HOMA-IR	3,2±2,4	3,9±2,4	0,493 [b]
HOMA-Beta	28,9±23,4	47,2±24,3	0,094 [b]
CT, mg/dL	170,6±27,4	226,8±33,9	<0,001[a]
LDL-C, mg/dL	103,0±22,8	150,3±27,8	<0,001 [a]
HDL-C, mg/dL	40,4±7,6	40,2±8,0	0,969 [a]
VLDL-C, mg/dL	27,2±12,1	36,2±17,2	0,155 [b]
TG, mg/dL	135,2±59,5	155,1±76,4	0,508 [b]
HbA1, %	6,4±0,9	7,4±2,6	0,856 [b]
Insulina, uU/mL	10,4±7,4	14,9±7,9	0,142 [b]
Fibrinogênio, mg/dL	303,4±78,2	389,6±88,8	0,089 [a]
PCR, mg/dL	2,8±2,8	2,1±0,8	0,786 [b]
IL-6, pg/mL	4,4±2,5	12,8±22,4	0,264 [b]
TNF-α,, pg/mL	7,4±7,2	6,6±2,9	0,729 [a]

Nota: Número de indivíduos em parêntesis. HDL-C: colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-C: colesterol da lipoproteína de baixa densidade; VLDL-C: colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade, IMC: Índice de massa corpórea; Hb1Ac: hemoglobina glicada; HOMA-IR: Homeostasis model assessment (resistência à insulina); HOMA--Beta: (função secretora da célula beta-pancreática), PCR: proteína C-reativa, IL-6: interleucina-6, TNF-α: fator de necrose tumoral. Os resultados apresentados como média ± desvio-padrão e comparados por teste-t de student[(a)] Mann-Whitney[(b)].*Obesidade considerada quando IMC>30 kg/m$^{2.}$

Tabela 28. Relação entre o polimorfismo *TNF* -308G>A e parâmetros antropométricos e perfil bioquímico em indivíduos com aterosclerose.

Variável	Total		
	Genótipos		
	GG (5)	GA+AA (10)	*P*
Glicemia jejum, mg/dL	119,7±20,4	117,6±10,4	0,690 [a]
Glicemia 120min, mg/dL	189,4±57,2	195,8±37,6	0,823 [b]
IMC, kg/m²	29,3±3,6	30,5±4,4	0,560 [a]
HOMA-IR	3,3±2,1	3,9±3,1	0,938 [b]
HOMA-Beta	36,8±25,8	31,2±22,8	0,684 [b]
CT, mg/dL	190,2±44,0	200,1±24,0	0,612 [a]
LDL-C, mg/dL	120,2±37,0	126,4±18,3	0,731 [b]
HDL-C, mg/dL	39,3±7,9	44,0±5,9	0,243 [a]
VLDL-C, mg/dL	30,7±16,0	30,8±10,4	0,575 [b]
Triglicérides, mg/dL	140,1±70,8	153,4±51,9	0,371 [b]
HbA1, %	7,0±2,1	6,2±0,6	0,649 [b]
Insulina uU/mL	11,9±7,5	12,3±9,0	0,935 [a]
Fibrinogênio, mg/dL	347,8±99,8	310,8±62,3	0,529 [a]
PCR , mg/dL	1,9±0,8	3,9±3,5	0,234 [a]
IL-6, pg/mL	5,0±2,6	3,9±3,5	0,970 [b]
TNF-α, pg/mL	7,9±6,4	4,5±1,3	0,109 [b]

Nota: Número de indivíduos em parêntesis. HDL-C: colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-C: colesterol da lipoproteína de baixa densidade; VLDL-C: colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade, IMC: Índice de massa corpórea; Hb1Ac: hemoglobina glicada; HOMA-IR: Homeostasis model assessment (resistência à insulina); HOMA--Beta: (função secretora da célula beta-pancreática), PCR: proteína C-reativa, IL-6: interleucina-6, TNF-α: fator de necrose tumoral. Os resultados apresentados como média ± desvio-padrão e comparados por teste-t de student[(a)] Mann-Whitney[(b)].*Obesidade considerada quando IMC>30 kg/m$^{2.}$

4.2.3 Resultados da expressão gênica

Na **Tabela 29** são apresentados os valores medianos e intervalos (25% - 75%) de expressão do mRNA dos genes TLR2, TLR4, IL-6 E TNF-α em LTSP no grupo com aterosclerose e grupo sem aterosclerose. Não houve diferenças estatisticamente significantes entre o grupo com aterosclerose e o grupo sem aterosclerose para os genes analisados (p>0,05). Contudo, observou-se expressão aumentada de *TLR2* em relação aos outros genes, tanto no grupo com aterosclerose, como no grupo sem aterosclerose.

Tabela 29. Valor de expressão do grupo com aterosclerose de *TLR2, TLR4, IL-6 e TNF-α* comparados aos valores do grupo sem aterosclerose.

Genes	**Com aterosclerose ($2^{-\Delta Ct}$) (23)**	**Sem aterosclerose ($2^{-\Delta Ct}$) (34)**	P
TLR2	0,243164 (0,0953-0,336)	0,237336(0,141-0,294)	0,513[a]
TLR4	0,000667(0,000527-0,00221)	0,000795(0,000481-0,00172)	0,779[a]
IL-6	0,000572(0,000325-0,000735)	0,000795(0,000316-0,00113)	0,928[a]
TNF-α	0,012976(0,00674-0,0170)	0,01294(0,00834-0,0181)	0,492[a]
P	p<0,001[b]	p<0,001[b]	

Nota: Número de indivíduos em parênteses. ΔCt: CT do gene alvo – Ct GAPD da amostra. Os resultados apresentados como mediana (25%-75%) e comparados por: Mann-Whitney Rank Sun Test [(a)],One-Way ANOVA on Ranks com análise de comparação múltipla de Tukey [(b)] .

A análise de correlação entre os parâmetros bioquímicos e os valores de expressão de mRNA dos genes *TLR2, TLR4, IL-6 e TNF-α* normalizados com o controle endógeno *GAPD* do grupo com aterosclerose está representada na **Tabela 30**.

Observou-se correlação negativa entre os valores de expressão de mRNA do gene *TLR2* com a insulina, com o índice Homa-Beta e com o triglicérides (respectivamente, rs -0,453 p=0,034; rs -0,544 p=0,009 e rs-0,435 p=0,038), essas correlações estão representadas na **Figura 12**, nos gráficos A, B e C respectivamente. Em relação ao gene *TNF-α* houve correlação negativa com triglicérides (rs -0,419 p=0,046), representado no gráfico D. Não houve correlação entre a variação da expressão gênica de *TLR4* e *IL-6* com a variação dos parâmetros bioquímicos em indivíduos com aterosclerose.

Tabela 30. Análise da correlação entre expressão de *TLR2, TLR4, IL-6 e TNF-α* e os parâmetros bioquímicos em indivíduos do grupo com aterosclerose.

Parâmetros	*TLR2*	*TLR4*	*IL-6*	*TNF-α*
Glicemia (mg/dL)	0,0224 p=0,299	0,0804 p=0,713	-0,0881 p=0,686	-0,0544 p=0,802
Glicemia 120 min. (mg/dL)	0,0503 p=0,821	-0,0249 p=0,908	0,169 p=0,447	-0,0920 p=0,679
HbA1c (%)	-0,0384 p=0,863	0,345 p=0,124	-0,127 p=0,577	0,0403 p=0,859
Insulina (uUI/mL)	-0,453 p=0,034	0,0152 p=0,563	0,159 p=0,475	-0,346 p=0,113
IMC (Kg/m2)	-0,314 p=0,142	0,0667 p=0,757	0,297 p=0,165	-0,349 p=0,101
Homa-IR (%)	-0,348 p=0,110	0,0412 p=0,852	0,199 p=0,593	-0,368 p=0,090
Homa-Beta (%)	-0,544 p=0,009	-0,0401 p=0,856	0,196 p=0,377	-0,340 p=0,119
Colesterol Total (mg/dL)	0,168 p=0,439	-0,269 p=0,210	0,0959 p=0,659	-0,0988 p=0,649
LDL-C (mg/dL)	0,178 p=0,412	-0,184 p=0,396	0,0608 p=0,778	-0,0470 p=0,827
HDL-C (mg/dL)	0,179 p=0,409	-0,402 p=0,056	-0,337 p=0,114	-0,115 p=0,598
VLDL-C (mg/dL)	-0,188 p=0,386	-0,0686 p=0,753	0,298 p=0,164	-0,175 p=0,420
Triglicérides (mg/dL)	-0,435 p=0,038	0,128 p=0,557	0,0692 p=0,750	-0,419 p=0,046
PCR	0,0486 p=0,848	0,154 p=0,563	0,302 p=0,247	-0,0560 p=0,831
Fibrinogênio	0,181 p=0,506	0,196 p=0,473	0,0751 p=0,783	0,0340 p=0,893
IL-6	0,105 p=0,630	0,131 p=0,545	-0,0130 p=0,951	0,308 p=0,158
TNF-α	-0,109 p=0,617	-0,249 0,248	-0,0336 p=0,876	-0,171 p=0,431

Nota: Números de indivíduos em parênteses. IMC: Índice de massa corpórea; HbA1c: hemoglobina glicada; HOMA-IR: *Homeostasis model assessment* (resistência à insulina); HOMA-beta: (função secretora da célula beta-pancreática); HDL-C: colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-C: colesterol da lipoproteína de baixa densidade; VLDL-C: colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade. A significância da correlação foi calculada por coeficiente de correlação de Pearson e Spearman (rs).

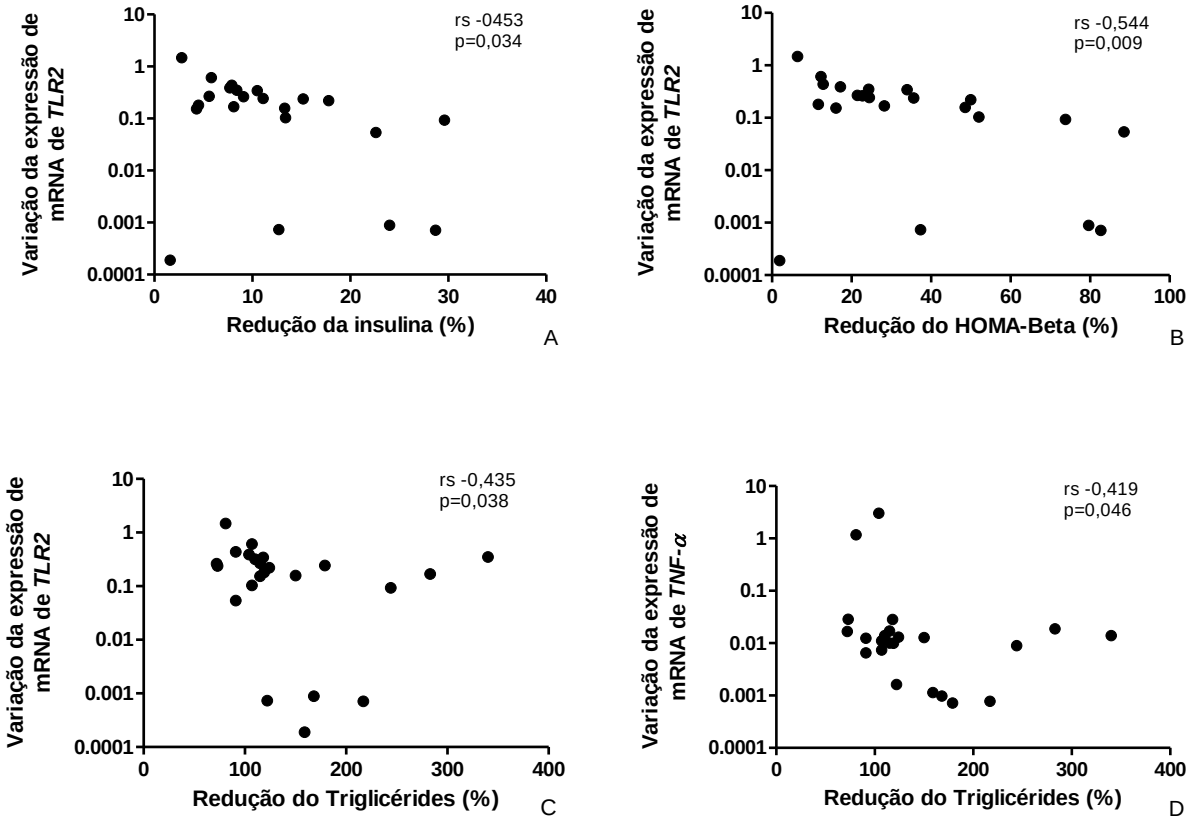


Figura 12. Análise de correlação entre as variações da expressão de mRNA do *TLR2 e TNF-α* ($\Delta Ct_{gene\ alvo}$- ΔCt_{GAPD}) nos indivíduos com aterosclerose. A: variação de *TLR2 vs* insulina; B: variação de *TLR2 vs* HOMA-Beta; C: variação de *TLR2 vs* triglicérides; D: variação de TNF-α *vs* triglicérides.

4.2.4 Resultados de efeito do polimorfismo -174G>C e -308G>A sobre expressão gênica do *IL-6* e *TNF-α* respectivamente

As expressões de mRNA do *IL-6* e *TNF-α* comparadas com os polimorfismos -174G>C e -308G>A são apresentadas nas **Tabelas 31 e 32,** respectivamente.

Tabela 31. Influência do polimorfismo -174G>C na expressão de mRNA do *IL-6* em indivíduos com aterosclerose e sem aterosclerose.

	GG (14)	**GC+CC (9)**	***P* (GG *vs*. CG/CC)**
Com aterosclerose *IL-6* ($2^{-\Delta Ct}$)	0,000436(0,000324-0,000617)	0.000751(0,000435-0,00115)	0,139
Sem aterosclerose *IL-6* ($2^{-\Delta Ct}$)	0,000436(0,000324-0,000617)	0,000521(0,000354-0,00122)	0,202

Nota: Número de indivíduos em parênteses. ΔCt: CT do gene alvo – Ct GAPD da amostra
Valores são apresentados como mediana (25%-75%) dos dados. Os resultados foram comparados por Mann-Whitney.

Tabela 32. Influência do polimorfismo -308G>A na expressão de mRNA do *TNF-α* em indivíduos com aterosclerose e sem aterosclerose.

	GG (18)	**GA+AA (5)**	***P* (GG *vs*. GA/AA)**
Com aterosclerose *TNF-α* ($2^{-\Delta Ct}$)	0,0129(0,00652-0,0171	0,00997(0,00687-0,0154)	0,434
Sem aterosclerose *TNF-α* ($2^{-\Delta Ct}$)	0,0133(0,00790-0,0221)	0,0121(0,00990-0,0145	0,637

Nota: Número de indivíduos em parênteses. ΔCt: CT do gene alvo – Ct GAPD da amostra
Valores são apresentados como mediana (25%-75%) dos dados. Os resultados foram comparados por Mann-Whitney.

4.3 Resultados dos grupos diabéticos com aterosclerose e sem aterosclerose

4.3.1 Dados biodemográficos

As características clínicas e os valores médios dos parâmetros bioquímicos dos indivíduos do grupo diabéticos com aterosclerose (n=21) e grupo diabéticos sem aterosclerose (n=13) incluídos no diabéticos estão apresentados na **Tabela 33.**

Nenhum dos parâmetros apresentou diferenças significativas entre os grupos analisados (p>0,05).

Tabela 33. Características biodemográficas e valores de exames bioquímicos do grupo diabéticos com aterosclerose e sem aterosclerose.

Parâmetro	Diabéticos com Ateroscerose (21)	Diabéticos sem Ateroscerose (13)	*P*
Gênero Masculino (%)	66,7% (14)	33,3% (7)	0,199[a]
Gênero Feminino (%)	53.8% (7)	46.2% (6)	
Obesidade (%)*	64,3% (9)	35,7% (5)	0,199[a]
IMC (kg/m2)	29,6±3,9	29,5±3,5	0,973[b]
Idade (anos)	62,6±8,4	59,3±10,6	0,336[b]
Hipertensão (%)	62,5% (10)	37,5% (6)	0,199[a]
Glicemia (mg/dL)	122,1±17,0	130,3±24,6	0,274[b]
Glicemia 120 min após 75g de glicose (mg/dL)	295,6±53,6	227,3±55,1	0,121[b]
Hb1Ac (%)	6,9±1,9	6,4±1,0	0,768[c]
Insulina (uUI/mL)	11,8±7,8	11,1±7,6	0,854[b]
Índice HOMA-IR (%)	3,4±2,5	3,2±2,3	0,967[b]
Índice HOMA-beta (%)	33,6±23,4	32,0±22,8	0,395[c]
Perfil lipídico (mg/dL)			
Colesterol total	196,0±39,6	195,3 ±54,8	0,644[c]
Triglicérides	145,9±69,8	152,4±84,8	1,000[c]
HDL-C	39,8±7,4	44,6±14,3	0,943[c]
LDL-C	124,7±32,9	117,0±47,5	0,956[c]
VLDL-C	31,5±15,4	32,4±15,9	0,810[b]
Fibrinogênio (mg/dL)	339,3±91,1	359,0±59,8	0,563[b]
PCR (mg/dL)	2,6±2,4	3,2±3,8	0,784[c]
IL-6 (pg/mL)	8,2±15,3	3,36±0,6	0,114[c]
TNF-α (pg/mL)	7,1±6,2	7,2±2,4	0,150[c]

Nota: Número de indivíduos em parêntesis. DM2: diabéticos tipo 2; IMC: Índice de massa corpórea; Hb1Ac: hemoglobina glicada; HOMA-IR: *Homeostasis model assessment* (resistência à insulina); HOMA-beta: (função secretora da célula beta-pancreática); HDL-C: colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-C: colesterol da lipoproteína de baixa densidade; VLDL-C: colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade, PCR: proteína C-reativa, IL-6: interleucina-6, TNF-α: fator de necrose tumoral. As variáveis categóricas foram comparadas por qui-quadrado(a). As variáveis contínuas são apresentadas como média ± DP e comparadas por Teste-t de student(b) ou Mann-Whitney(c). *Obesidade considerada quando IMC>30 kg/m$_2$.

4.3.2 Análise dos polimorfismos Arg753Gln, Thr399Ile, -174G>C, Asp299Gly e -308G>A

A distribuição de genótipos e a freqüência relativa de alelos para os polimorfismos Arg753Gln, Thr399Ile, -174G>C, Asp299Gly e -308G>A no grupo diabéticos com aterosclerose e sem aterosclerose estão respectivamente apresentadas nas **Tabelas 34, 35, 36, 37 e 38.**

Tabela 34. Freqüências genotípicas e alélicas do polimorfismo Arg753Gln do gene TLR2 em indivíduos do grupo diabéticos com aterosclerose e sem aterosclerose.

Grupos	Genótipos			Alelos	
	GG	GA	AA	G	A
Diabéticos com aterosclerose (21)	100% (21)	0% (0)	0% (0)	100%	0%
Diabéticos sem aterosclerose (13)	100% (13)	0% (0)	0% (0)	100 %	0%
		* *p=0,333*		* *p*=1,000	
Total (34)	100% (34)	0% (0)	0% (0)	100 %	0 %

Nota: número de indivíduos entre parêntesis. ***** Teste exato de Fisher.
Obs: o equilíbrio de Hardy-Weinberg não pode ser feito, pois, não existem pacientes portadores do alelo A.

Tabela 35. Freqüências genotípicas e alélicas do polimorfismo Thr399Ile do gene TLR4 em indivíduos do grupo diabéticos com aterosclerose e sem aterosclerose.

Grupos	Genótipos			Alelos	
	CC	CT	TT	C	T
Diabéticos com aterosclerose (21)	95,2% (20)	4,8% (1)	0% (0)	97,6%	2,4%
Diabéticos sem aterosclerose (13)	100% (13)	0% (0)	0% (0)	100%	0%
	χ^2= 3,000 (2 gl, *p=0,223*)			* *p*=1,000	
Total (34)	97,1% (33)	2,9% (1)	0% (0)	98,5%	1,5%
EHW	χ^2=-0,457	(*p<0,05*)			

Nota: número de indivíduos entre parêntesis. ***** Teste exato de Fisher. EHW: equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 36. Freqüências genotípicas e alélicas do polimorfismo -174G>C do gene IL-6 em indivíduos diabéticos com aterosclerose e sem aterosclerose.

Grupos	Genótipos			Alelos	
	GG	GC	CC	G	C
Diabéticos com aterosclerose (21)	57,1% (12)	33,4% (7)	9,5% (2)	73,8%	26,2%
Diabéticos sem aterosclerose (13)	30,8% (4)	53,8% (7)	15,4% (2)	57,7%	42,3%
	χ^2= 3,000 (2 gl, *p=0,223*)			* *p*=1,000	
Total (34)	47% (16)	41,2% (14)	11,8% (4)	67,6%	32,4%
EHW	χ^2=4,361	(*p>0,05*)			

Nota: número de indivíduos entre parêntesis. ***** Teste exato de Fisher. EHW: equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 37. Freqüências genotípicas e alélicas do polimorfismo Asp299Gly do gene TLR4 em indivíduos diabéticos com aterosclerose e sem aterosclerose.

Grupos	Genótipos			Alelos	
	AA	AG	GG	A	G
Diabéticos com aterosclerose (21)	81% (17)	19% (4)	0% (0)	90,5%	9,5%
Diabéticos sem aterosclerose (13)	100% (13)	0% (0)	0% (0)	100%	0%
	χ^2= 3,000 (2 gl, *p=0,223*)			**p=1*,000	
Total (34)	88,2% (30)	11,8% (4)	0% (0)	94,1%	5,9%
EHW	χ^2=2,415	(*p<0,05*)			

Nota: número de indivíduos entre parêntesis. ***** Teste exato de Fisher. EHW: equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 38. Freqüências genotípicas e alélicas do polimorfismo -308G>A do gene TNF-α em indivíduos diabéticos com aterosclerose e sem aterosclerose.

Grupos	Genótipos			Alelos	
	GG	GA	AA	G	A
Diabéticos com aterosclerose (21)	76,2% (16)	19% (4)	4,8% (1)	85,7%	14,3%
Diabéticos sem aterosclerose (13)	76,9% (10)	15,4% (2)	7,7% (1)	84,6%	15,4%
	χ^2= 6,000 (4 gl, *p=0,199*)			**p=1*,000	
Total (34)	76,5% (26)	17,6 % (6)	5,9% (2)	85,6%	14,7%
EHW	χ^2=3,793	(*p<0,05*)			

Nota: número de indivíduos entre parêntesis. ***** Teste exato de Fisher. EHW: equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Os parâmetros antropométricos e os valores dos exames bioquímicos do grupo diabéticos com aterosclerose e sem aterosclerose de acordo com os genótipos dos polimorfismos -174G>C, Asp299Gly e -308G>A estão respectivamente apresentados nas **Tabelas 39, 40, 41, 42 e 43**.

Como não foi encontrado nenhum paciente que contém o alelo A do polimorfismo Arg753Gln no grupo diabéticos com aterosclerose e nem no grupo diabéticos sem aterosclerose, não pode ser feita a análise comparativa entre os genótipos.

O mesmo ocorreu com o polimorfismo Thr399Ile, que apresentou apenas um indivíduo com o alelo T no grupo diabéticos com aterosclerose e nenhum no grupo diabéticos sem aterosclerose.

No polimorfismo -174G>C para o grupo diabéticos com aterosclerose as concentrações séricas de glicemia de jejum e glicemia 120 min após sobrecarga de glicose foram maiores nos indivíduos com genótipo GG que em portadores do alelo C. E os valores de Homa-Beta, CT e LDL foram maiores em indivíduos portadores do alelo C que em indivíduos com o genótipo GG.

Esse mesmo polimorfismo, mas agora para o grupo diabéticos sem aterosclerose, nenhum parâmetro analisado mostrou significância ($p>0,050$).

O polimorfismo Asp299Gly apresentou valores séricos de glicemia 120 min após sobrecarga de glicose maiores entre os pacientes do grupo diabéticos com aterosclerose portadores do alelo G que em indivíduos com o genótipo AA.

Para esse polimorfismo, no grupo diabéticos sem aterosclerose não foi possível fazer uma análise comparativa entre os genótipos, pois, não foi encontrado nenhum indivíduo portador do alelo G.

Na análise comparativa do polimorfismo -308G>A tanto para o grupo diabéticos com aterosclerose quanto nos sem aterosclerose, nenhum parâmetro analisado apresentou significância.

Tabela 39. Relação entre o polimorfismo IL-6 -174 G>C e parâmetros antropométricos e perfil bioquímico em indivíduos diabéticos com aterosclerose.

Variável	Total		
	Genótipos		
	GG (12)	GC+CC (9)	*P*
Glicemia jejum, mg/dL	128,6±18,8	113,4±8,8	0,046 [a]
Glicemia 120min, mg/dL	217,4±53,6	168,8±39,7	0,046 [a]
IMC, kg/m²	29,2±4,1	30,1±3,7	0,617[a]
HOMA-IR	3,1±2,5	3,9±2,4	0,510 [a]
HOMA-Beta	24,5±17,8	47,2±24,3	0,035 [a]
CT, mg/dL	172,9±25,3	226,8±33,9	<0,001 [a]
LDL-C, mg/dL	105,4±21,3	150,3±27,8	<0,001 [a]
HDL-C, mg/dL	39,5±6,8	40,2±8,0	0,834 [a]
VLDL-C, mg/dL	28,0±13,0	36,2±17,2	0,212 [b]
TG, mg/dL	139,0±63,5	115,1±76,4	0,594 [b]
HbA1, %	6,5±0,9	7,4±2,6	0,969 [b]
Insulina, uU/mL	9,8±7,0	14,9±7,9	0,169 [a]
Fibrinogênio, mg/dL	296,3±68,1	389,6±88,8	0,075 [a]
PCR , mg/dL	3,0±3,1	2,1±0,8	0,948 [b]
IL-6, pg/mL	4,6±2,7	12,8±22,4	0,371 [b]
TNF-α,, pg/mL	7,4±7,7	6,7±2,9	0,500 [b]

Nota: Número de indivíduos em parêntesis. HDL-C: colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-C: colesterol da lipoproteína de baixa densidade; VLDL-C: colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade, IMC: Índice de massa corpórea; Hb1Ac: hemoglobina glicada; HOMA-IR: Homeostasis model assessment (resistência à insulina); HOMA--Beta: (função secretora da célula beta-pancreática), PCR: proteína C-reativa, IL-6: interleucina-6, TNF-α: fator de necrose tumoral. Os resultados apresentados como média ± desvio-padrão e comparados por teste-t de student[(a)] Mann-Whitney[(b)].*Obesidade considerada quando IMC>30 kg/m$^{2.}$

Tabela 40. Relação entre o polimorfismo IL-6 -174 G>C e parâmetros antropométricos e perfil bioquímico em indivíduos diabéticos sem aterosclerose.

Variável	Total		
	Genótipos		
	GG (4)	GC+CC (9)	*P*
Glicemia jejum, mg/dL	129,8±20,5	130,6±26,3	0,961 [a]
Glicemia 120min, mg/dL	265,3±53,9	210,4±46,7	0,143 [b]
IMC, kg/m²	30,0±2,4	30,1±3,7	0,800 [a]
HOMA-IR	2,7±0,8	3,4±2,7	0,633 [a]
HOMA-Beta	29,2±12,6	33,3±26,0	0,787 [a]
CT, mg/dL	201,8±69,8	192,4±47,0	0,799 [a]
LDL-C, mg/dL	135,3±58,7	108,9±39,0	0,399 [a]
HDL-C, mg/dL	44,5±7,4	44,7±16,4	0,986 [a]
VLDL-C, mg/dL	22,0±6,8	37,0±16,4	0,138 [a]
TG, mg/dL	110,3±33,6	171,2±93,5	0,396 [b]
HbA1, %	6,4±0,3	6,4±1,2	0,876 [a]
Insulina, uU/mL	9,9±3,2	11,7±8,8	0,712 [a]
Fibrinogênio, mg/dL	349,7±40,8	364,4±67,8	0,729 [a]
PCR , mg/dL	2,4±3,3	3,7±4,0	0,448 [b]
IL-6, pg/mL	3,2±0,2	3,4±0,7	0,757 [b]
TNF-α,, pg/mL	6,4±2,1	7,6±2,4	0,441 [b]

Nota: Número de indivíduos em parêntesis. HDL-C: colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-C: colesterol da lipoproteína de baixa densidade; VLDL-C: colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade, IMC: Índice de massa corpórea; Hb1Ac: hemoglobina glicada; HOMA-IR: Homeostasis model assessment (resistência à insulina); HOMA--Beta: (função secretora da célula beta-pancreática), PCR: proteína C-reativa, IL-6: interleucina-6, TNF-α: fator de necrose tumoral. Os resultados apresentados como média ± desvio-padrão e comparados por teste-t de student[(a)] Mann-Whitney[(b)].*Obesidade considerada quando IMC>30 kg/m$^{2.}$

Tabela 41. Relação entre o polimorfismo TLR4 Asp299Gly e parâmetros antropométricos e perfil bioquímico em indivíduos diabéticos com aterosclerose.

Variável	Total		
	Genótipos		
	AA (17)	AG+GG (4)	*P*
Glicemia jejum, mg/dL	129,4±18,3	129,2±5,8	0,106 [b]
Glicemia 120min, mg/dL	182,6±52,3	247,2±9,2	0,016 [b]
IMC, kg/m²	29,3±3,8	30,8±4,5	0,504 [a]
HOMA-IR	3,2±2,2	4,6±4,5	0,318 [a]
HOMA-Beta	31,8±23,3	40,6±22,5	0,530 [a]
CT, mg/dL	194,4±36,2	203,0±51,1	0,712 [a]
LDL-C, mg/dL	122,9±31,1	132,0±38,9	0,641 [a]
HDL-C, mg/dL	39,2±7,2	42,5±7,2	0,441 [a]
VLDL-C, mg/dL	32,2±15,9	28,5±13,1	0,621 [b]
Triglicérides, mg/dL	146,7±70,9	142,5±64,8	0,754 [b]
HbA1, %	6,8±2,0	7,0±1,3	0,636 [b]
Insulina uU/mL	11,1±7,3	14,9±8,7	0,398 [a]
Fibrinogênio, mg/dL	331,9±90,9	429,0±0,2	0,315 [b]
PCR , mg/dL	2,0±1,0	6,3±4,3	0,082 [b]
IL-6, pg/mL	8,8±16,9	5,3±2,6	0,822 [b]
TNF-α, pg/mL	7,7±6,8	4,3±1,1	0,139 [b]

Nota: Número de indivíduos em parêntesis. HDL-C: colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-C: colesterol da lipoproteína de baixa densidade; VLDL-C: colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade, IMC: Índice de massa corpórea; Hb1Ac: hemoglobina glicada; HOMA-IR: Homeostasis model assessment (resistência à insulina); HOMA--Beta: (função secretora da célula beta-pancreática), PCR: proteína C-reativa, IL-6: interleucina-6, TNF-α: fator de necrose tumoral. Os resultados apresentados como média ± desvio-padrão e comparados por teste-t de student[(a)] Mann-Whitney[(b)].*Obesidade considerada quando IMC>30 kg/m$^{2.}$

Tabela 42. Relação entre o polimorfismo TNF -308G>A e parâmetros antropométricos e perfil bioquímico em indivíduos diabéticos com aterosclerose.

Variável	Total		
	Genótipos		
	GG (46)	GA+AA (15)	*P*
Glicemia jejum, mg/dL	120,1±17,7	128,4±12,8	0,368 [a]
Glicemia 120min, mg/dL	195,5±58,0	195,8±37,6	0,991 [a]
IMC, kg/m²	29,3±3,8	30,4±4,4	0,585 [a]
HOMA-IR	3,3±2,1	3,9±3,2	0,930 [b]
HOMA-Beta	34,4±23,6	31,2±22,8	0,809 [a]
CT, mg/dL	194,4±43,2	201,2±24,0	0,752 [a]
LDL-C, mg/dL	124,1±36,3	126,4±18,3	0,899 [a]
HDL-C, mg/dL	38,5±7,2	44,0±5,9	0,159 [a]
VLDL-C, mg/dL	31,7±16,7	30,8±10,5	0,709 [b]
Triglicérides, mg/dL	143,6±74,3	153,4±51,9	0,457 [b]
HbA1, %	7,1±2,1	6,2±0,7	0,541 [b]
Insulina uU/mL	11,7±7,3	12,3±9,0	0,882 [a]
Fibrinogênio, mg/dL	352,1±2,7	310,8±62,3	0,493 [a]
PCR , mg/dL	1,9±0,9	3,9±3,5	0,317 [a]
IL-6, pg/mL	5,2±2,7	17,6±29,1	0,835 [b]
TNF-α, pg/mL	7,8±6,8	4,5±1,3	0,173 [b]

Nota: Número de indivíduos em parêntesis. HDL-C: colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-C: colesterol da lipoproteína de baixa densidade; VLDL-C: colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade, IMC: Índice de massa corpórea; Hb1Ac: hemoglobina glicada; HOMA-IR: Homeostasis model assessment (resistência à insulina); HOMA--Beta: (função secretora da célula beta-pancreática), PCR: proteína C-reativa, IL-6: interleucina-6, TNF-α: fator de necrose tumoral. Os resultados apresentados como média ± desvio-padrão e comparados por teste-t de student[(a)] Mann-Whitney[(b)].*Obesidade considerada quando IMC>30 kg/m$^{2.}$

Tabela 43. Relação entre o polimorfismo TNF -308G>A e parâmetros antropométricos e perfil bioquímico em indivíduos diabéticos sem aterosclerose.

Variável	Total		
	Genótipos		
	GG (10)	GA+AA (3)	*P*
Glicemia jejum, mg/dL	125,6±20,0	146,0±31,3	0,243 [a]
Glicemia 120min, mg/dL	230,8±58,5	215,7±40,2	0,707 [a]
IMC, kg/m²	29,9±3,2	28,6±4,1	0,595 [a]
HOMA-IR	3,2±2,6	3,0±0,6	0,673 [b]
HOMA-Beta	34,6±24,5	23,2±12,9	0,490 [a]
CT, mg/dL	197,4±59,5	188,3±34,3	0,821 [a]
LDL-C, mg/dL	123,2±47,1	96,3±42,8	0,433 [a]
HDL-C, mg/dL	47,7±13,8	34,3±10,7	0,183 [a]
VLDL-C, mg/dL	31,7±15,1	34,7±18,0	0,791 [a]
Triglicérides, mg/dL	146,0±82,0	173,7±90,3	0,655 [a]
HbA1, %	6,4±1,1	6,4±0,7	0,968 [a]
Insulina uU/mL	11,7±8,4	9,3±3,3	0,660 [a]
Fibrinogênio, mg/dL	373,9±55,7	292,0±15,0	0,095 [b]
PCR , mg/dL	3,8±4,0	0,4±0,2	0,155 [b]
IL-6, pg/mL	3,3±0,4	3,6±0,9	0,921 [b]
TNF-α, pg/mL	7,7±2,3	5,6±1,9	0,224 [a]

Nota: Número de indivíduos em parêntesis. HDL-C: colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-C: colesterol da lipoproteína de baixa densidade; VLDL-C: colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade, IMC: Índice de massa corpórea; Hb1Ac: hemoglobina glicada; HOMA-IR: Homeostasis model assessment (resistência à insulina); HOMA--Beta: (função secretora da célula beta-pancreática), PCR: proteína C-reativa, IL-6: interleucina-6, TNF-α: fator de necrose tumoral. Os resultados apresentados como média ± desvio-padrão e comparados por teste-t de student[(a)] Mann-Whitney[(b)].*Obesidade considerada quando IMC>30 kg/m$^{2.}$

4.3.3 Resultados da expressão gênica

Na **Tabela 44** são apresentados os valores medianos e intervalos (25% - 75%) de expressão do mRNA dos genes TLR2, TLR4, IL-6 E TNF-α no grupo diabéticos com aterosclerose e grupo diabéticos sem aterosclerose. Não houve diferenças estatisticamente significantes entre o grupo diabéticos com aterosclerose e o grupo diabéticos com aterosclerose para nenhum dos genes analisados (p>0,05). Contudo, observou-se expressão aumentada de *TLR2* em relação aos outros genes, tanto no grupo diabéticos com aterosclerose, como no grupo diabéticos sem aterosclerose.

Tabela 44. Valor de expressão do grupo diabéticos com aterosclerose de *TLR2, TLR4, IL-6 e TNF-α* comparados aos valores do grupo diabéticos sem aterosclerose.

Genes	**Diabéticos com aterosclerose ($2^{-\Delta Ct}$) (21)**	**Diabéticos sem aterosclerose ($2^{-\Delta Ct}$) (13)**	P
TLR2	0,243 (0,116-0,353)	0,237 (0,161-0,261)	0,405[a]
TLR4	0,000667(0,000532-0,00119)	0,000795(0,000608-0,00127)	0,605[a]
IL-6	0,000572(0,000318-0,000760)	0,000443(0,000289-0,000698)	0,845[a]
TNF-α	0,0130 (0,0101-0,0246)	0,0129(0,000975-0,0187)	0,859[a]
P	p<0,001[b]	p<0,001[b]	

Nota: Número de indivíduos em parênteses. ΔCt: CT do gene alvo – Ct GAPD da amostra. Os resultados apresentados como mediana (25%-75%) e comparados por: Mann-Whitney Rank Sun Test [(a)],One-Way ANOVA on Ranks com análise de comparação múltipla de Tukey [(b)] .

A análise de correlação entre os parâmetros bioquímicos e os valores de expressão de mRNA dos genes *TLR2, TLR4, IL-6 e TNF-α* normalizados com o controle endógeno *GAPD* do grupo diabéticos com aterosclerose está representada na **Tabela 45**.

Observou-se correlação negativa entre a variação da expressão gênica de *IL-6* e a variação de HDL (rs -0,451; p=0,040), essa correlação está representada na **Figura 13**, no gráfico A. Em relação ao gene *TNF-α,* houve correlação negativa com o HDL-C (rs -0,478; p=0,028), representado no gráfico B. Não houve correlação entre a variação da expressão gênica de *TLR4* e *TLR2* com a variação dos parâmetros bioquímicos em indivíduos do grupo diabéticos com aterosclerose.

Tabela 45. Análise da correlação entre expressão de *TLR2, TLR4, IL-6 e TNF-α* e os parâmetros bioquímicos em indivíduos do grupo diabéticos com aterosclerose.

Parâmetros	*TLR2*	*TLR4*	*IL-6*	*TNF-α*
Glicemia (mg/dL)	0,137 p=0,550	0,136 p=0,554	-0,104 p=0,649	-0,213 p=0,349
Glicemia 120 min. (mg/dL)	-0,0105 p=0,962	0,111 p=0,635	0,182 p=0,437	-0,0556 p=0,811
HbA1c (%)	0,167 p=0,476	0,265 p=0,255	-0,0248 p=0,911	0,249 p=0,283
Insulina (uUI/mL)	-0,304 p=0,189	-0,0388 p=0,881	-0,0602 p=0,797	0,0316 p=0,353
IMC (Kg/m2)	-0,204 p=0,370	0,108 p=0,633	0,264 p=0,244	-0,0779 p=0,733
Homa-IR (%)	-0,126 p=0,590	0,00226 p=0,987	0,0406 p=0,861	0,0135 p=0,952
Homa-Beta (%)	-0,356 p=0,120	-0,0361 p=0,876	0,0752 p=0,748	0,0797 p=0,733
Colesterol Total (mg/dL)	0,164 p=0,469	-0,318 p=0,157	0,0403 p=0,859	-0,0663 p=0,771
LDL-C (mg/dL)	0,0903 p=0,690	-0,122 p=0,593	0,00975 p=0,962	-0,0832 p=0,716
HDL-C (mg/dL)	-0,146 p=0,520	-0,232 p=0,308	-0,451 p=0,040	-0,478 p=0,028
VLDL-C (mg/dL)	0,0378 p=0,868	-0,308 p=0,171	0,324 p=0,150	0,135 p=0,554
Triglicérides (mg/dL)	-0,206 p=0,364	-0,117 p=0,609	0,0760 p=0,737	-0,129 p=0,569
PCR	0,0814 p=0,773	0,134 p=0,637	0,255 p=0,364	0,150 p=0,594
Fibrinogênio	0,325 p=0,269	0,0317 p=0,906	0,0634 p=0,821	0,160 p=0,591
IL-6	0,123 p=0,589	0,239 p=0,292	-0,00523 p=0,980	0,361 p=0,106
TNF-α	-0,353 p=0,114	-0,106 p=0,408	-0,0247 p=0,912	-0,371 p=0,095

Nota: Números de indivíduos em parênteses. IMC: Índice de massa corpórea; HbA1c: hemoglobina glicada; HOMA-IR: *Homeostasis model assessment* (resistência à insulina); HOMA-beta: (função secretora da célula beta-pancreática); HDL-C: colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-C: colesterol da lipoproteína de baixa densidade; VLDL-C: colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade. A significância da correlação foi calculada por coeficiente de correlação de Pearson e Spearman (rs).

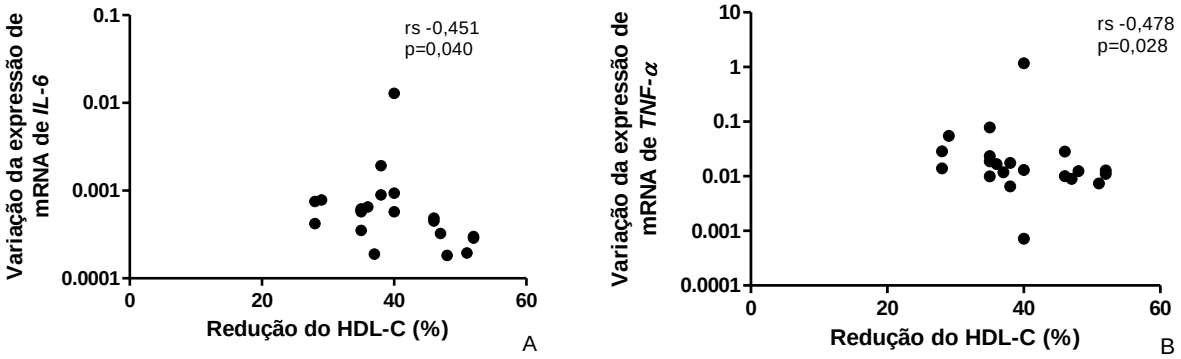


Figura 13. Análise de correlação entre as variações da expressão de mRNA do *IL-6 e TNF-α* ($\Delta Ct_{gene\ alvo}$- ΔCt_{GAPD}) nos indivíduos diabéticos com aterosclerose. A: variação de *IL-6 vs* HDL-C; B: variação de *TNF-α vs* HDL-C.

4.3.4 Resultados de efeitos do polimorfismo -174G>C e -308G>A sobre a expressão gênica do *IL-6* e *TNF-α*

As expressões de mRNA do *IL-6* e *TNF-α* comparadas com os polimorfismos Thr299Ile, Asp299Gly, -174G>C e -308GA são apresentadas nas **Tabelas 46 e 47**, respectivamente.

Tabela 46. Influência do polimorfismo -174G>C na expressão de mRNA do *IL-6* em indivíduos do grupo diabéticos com aterosclerose e grupo diabéticos sem aterosclerose.

	GG (12)	**GC+CC (9)**	***P* (GG *vs*. CG/CC)**
Diabéticos com aterosclerose *IL-6* ($2^{-\Delta Ct}$)	0,000436(0,000312-0,000608)	0,000751(0,000435-0,00115)	0,145
Diabéticos sem aterosclerose *IL-6* ($2^{-\Delta Ct}$)	0,000434(0,000179-0,000896)	0,000443(0,000369-0,000698)	0,589

Nota: Número de indivíduos em parênteses. ΔCt: CT do gene alvo – Ct GAPD da amostra
Valores são apresentados como mediana (25%-75%) dos dados. Os resultados foram comparados por teste-t de student(a) e Mann-Whitney (b).

Tabela 47. Influência do polimorfismo -308G>A na expressão de mRNA do *TNF-α* em indivíduos do grupo diabéticos com aterosclerose e grupo diabéticos sem aterosclerose.

	GG (16)	**GA+AA (5)**	***P* (GG *vs*. GA/AA)**
Diabéticos com aterosclerose *TNF-α* ($2^{-\Delta Ct}$)	0,00997(0,00687-0,0154)	0,0153(0,0121-0,0260)	0,091
Diabéticos sem aterosclerose *TNF-α* ($2^{-\Delta Ct}$)	0,0131(0,00974-0,0180)	0,0129(0,0116-0,0576)	0,673

Nota: Número de indivíduos em parênteses. ΔCt: CT do gene alvo – Ct GAPD da amostra
Valores são apresentados como mediana (25%-75%) dos dados. Os resultados foram comparados por teste-t de student teste-*t*(a); teste-*t* pareado (b); Wilcoxon Signed Rank Test (c) e Mann-Whitney (d).

4.4 Resultados de estimativa de risco

Os dados da análise do risco para o DM2 e para a aterosclerose estão apresentados nas **Tabelas 48 e 49.**

O gênero masculino e a menopausa estão relacionados com o risco de DM2 e o DM2 está relacionado com o risco para aterosclerose. Para os polimorfismos o único que apresentou relação com uma das duas doenças analisadas foi a IL-6, que está relacionado com o risco para aterosclerose.

Tabela 48. Risco relativo de diabetes e aterosclerose

Doença	Parâmetro	Odds Ratio	IC (95%)		p-valor
			LI	LS	
DM2	Gênero (masculino)	3,401	1,467	7,885	0,004[a]
	Menopausa	3,025	1,230	7,440	0,030[a]
Aterosclerose	Gênero (masculino)	1,714	0,415	7,082	0,093[a]
	Hipertensão	0,875	0,218	3,518	0,783[a]
	Menopausa	1,600	0,324	7,905	0,102[b]
	DM2	16,962	3,401	7,885	<0,001[a]

Nota: IC: intervalo de confiança, LI: limite inferior e LS: limite superior. As variáveis categóricas foram comparadas por qui-quadrado(a) ou Teste exato de Fisher (b).

Tabela 49. Risco relativo de diabetes e aterosclerose para os polimorfismos de *Il-6, TLR4 e TNF- α*

Doença	Polimorfismo	Odds Ratio	IC (95%)		p-valor
			LI	LS	
DIABETES TIPO 2	*IL-6* -174G>C	0,590	0,262	1,331	0,224
	TLR4 Thr399Ile	1,629	0,383	6,932	0,780
	TLR4 Asp299Gly	0,764	0,180	3,251	1,000
	TNF-α -308G>A	0,920	0,357	2,369	1,000
ATEROSCLEROSE	*IL-6* -174G>C	3,000	0,696	12,999	0,352
	TLR4 Thr399Ile*	-	-	-	0,404
	TLR4 Asp299Gly*	-	-	-	0,146
	TNF-α -308G>A	0,960	0,187	4,924	0,769

Nota: IC: intervalo de confiança, LI: limite inferior e LS: limite superior. Os polimorfismos foram comparados pelo Teste exato de Fisher. *Não é possível o cálculo de odds ratio, pois não ocorreu na amostra o alelo raro.

5. DISCUSSÃO

5.1 Grupos diabéticos e controle

Os principais mecanismos da manifestação clinica do DM2 estão relacionados principalmente a menor ação da insulina nos tecidos periféricos, resistência, ou à menor concentração da insulina sérica, ou seja, insuficiência na síntese e liberação pelas ilhotas pancreáticas, ou ambas a secreção de insulina pelas células beta é insuficiente para compensar o estado de resistência, gerando um estado hiperglicemia. Este defeito faz com que no tecido hepático ocorra aumento da produção de glicose, cuja liberação para a circulação é causa significativa de hiperglicemia de jejum. A resistência à ação da insulina aparece primariamente associada a uma série de fatores de risco metabólicos conhecidos como Síndrome Metabólica como aumento de triglicérides, aumento de glicemia e diminuição de HDL colesterol. (HICKMAN & MACDONALD, 2007; BATSIS *et al.*, 2007).

Ao analisar as características biodemográficas observa-se uma maior freqüência de mulheres pós-menopausa no grupo diabéticos e uma maior freqüência de mulheres pré-menopausa no grupo controle. Como esperado foi observado que a glicemia de jejum, a glicemia de 120 min após 75g de glicose, o HbA1c, índice HOMA-IR e a insulina são maiores nos indivíduos do grupo diabético que nos do grupo controle. A idade média dos pacientes do grupo diabéticos foi maior que no controle. Já o valor de HDL é maior no grupo controle que no grupo diabéticos.

Após a análise de regressão as variáveis gênero masculino, índice HOMA-IR, HDL-C e insulina ainda mantiveram significância, mesmo considerando os outros fatores, mostrando que estão bem relacionadas com o DM2.

No polimorfismo Arg753Gln do gene TLR2 o alelo A mostrou ser raro na população estudada. Folwaczny e colaboradores (2004) também encontraram uma baixa freqüência desse alelo em seu estudo, no qual o alelo A foi encontrado em 2,9% (7/244) em indivíduos com periodontite comparado com 4,1% (10/244) no grupo controle.

A análise da relação entre o polimorfismo -174 G>C do gene IL-6 e o perfil bioquímico em indivíduos do grupo diabéticos demonstrou que os indivíduos com o genótipo GG apresentaram o valor de glicemia maior que em pacientes portadores do alelo C. Já os indivíduos portadores do alelo C apresentaram o colesterol total, o VLDL e os triglicérides maior que nos indivíduos sem a presença desse alelo. Diferente do que foi encontrado nesse estudo, Fernández-Real e colaboradores (2004) demonstraram que indivíduos normoglicêmicos portadores do alelo G apresentaram valores de VLDL e triglicérides maiores que nos portadores do alelo C, isso provavelmente devido ao fato do presente projeto estudar indivíduos com DM2 e não normoglicêmicos como estudado por Fernández-Real e colaboradores.

A análise da relação do polimorfismo -308 G>A do gene TNF-α e o perfil bioquímico em indivíduos do grupo diabéticos, os indivíduos portadores do alelo G apresentaram valor de fibrinogênio maior que os portadores do genótipo GA+AA. Nenhum dado semelhante foi encontrado, porém, levando em consideração que no grupo diabéticos o alelo G está relacionado com o aumento do mRNA do *TNF-α,* e que

o TNF-α é uma citocina pró-inflamatória que inibe a ação da insulina, e a inflamação crônica é tipicamente encontrada em DM2, o fibrinogênio pode ser parte dessa relação.

No presente estudo os indivíduos diabéticos tiveram a expressão do gene *TLR4* maior que no grupo controle. Estudos sugerem que a ativação do sistema imune inato, ativado pelo TLR4, está intimamente associada com o DM2 devido ao aumento de marcadores inflamatórios circulantes como proteína C-reativa, reagentes de fase aguda e IL-6, que tem mostrado ser preditivo do desenvolvimento de DM2 (KIM *et al*., 2008; FREEMAN *et al*., 2002).

Na comparação da relação dos polimorfismos com a expressão gênica, o gene polimorfismo -308 G>A mostrou ter influência na expressão do mRNA do *TNF-α,* o genótipo GG está relacionada com uma maior expressão de gene TNF-α, que os genótipos GA+AA. Porém, no estudo de Sookoian e colaboradores (2005), o alelo A do polimorfismo -308 G>A foi associado com o aumento da expressão de TNF-α. Isso pode ser explicado pelo fato da correlação entre os genótipos do polimorfismo -308G>A na região promotora do gene TNF-α e o diabetes produzir resultados muito controversos, as diferenças étnicas devem ter um papel importante neste conflito de resultados, pois, a distribuição genotípica é diferente entre os sujeitos estudados com diferentes origens raciais (SOOKOIAN *et al*.; 2005, SHIAN *et al*.;2003).

Quando comparado com os parâmetros bioquímicos o mRNA do *TLR4* apresentou uma correlação negativa com a glicemia e com o VLDL-C. Porém, mesmo tendo correlação negativa, este estudo mostra uma associação da glicemia acima de 100mg/dL e o gene TLR4.

5.2 Grupo com aterosclerose e sem aterosclerose

Ao analisar as características biodemográficas foi observado que na população avaliada a média de idade dos pacientes com aterosclerose (62 anos) foi maior que nos pacientes sem aterosclerose (55 anos). Isso ocorre, pois a aterosclerose começa a se desenvolver cedo na adolescência e se desenvolve durante o curso de 50 anos, e forma progressiva por meio da evolução continua das lesões na parede arterial centrada no acúmulo de lipídeos ricos em colesterol e acompanhado de resposta inflamatória, e o avanço do ateroma ocorre em pessoas com idade superior a 55 anos (INSULL *et al*., 2009).

Analisando os parâmetros bioquímicos observou-se que a glicemia de jejum e a glicemia 120 min após sobrecarga de glicose foram maiores em indivíduos com aterosclerose que nos sem a presença dessa doença. Estudos demonstraram que pacientes com DM2 tem um risco de três a quatro vezes maior de desenvolver aterosclerose que em indivíduos não diabéticos (AHMED *et al*., 2009).

Após a regressão nenhuma das variáveis apresentou significância para a relação com a aterosclerose, mostrando que nenhuma delas está fortemente relacionada com a aterosclerose.

Na análise da relação entre o polimorfismo -174 G>C do gene IL-6 e o perfil bioquímico em indivíduos com aterosclerose foi observada uma maior concentração sérica de colesterol total e LDL nos portadores do alelo C que nos indivíduos com o genótipo GG. Berg e colaboradores (2009) também encontraram relação entre a hipercolesterolemia e indivíduos portadores do alelo C para o polimorfismo -174 G>C do gene IL-6, em pacientes com doença arterial coronariana.

E na análise do polimorfismo Asp299Gly do gene TLR4 e os parâmetros bioquímicos em indivíduos com aterosclerose a glicemia 120 min após sobrecarga de glicose foi maior em indivíduos portadores do alelo G que em indivíduos com o genótipo AA. Entretanto no estudo realizado por Steinhardt e colaboradores (2009), os marcadores de resistência a insulina estavam significativamente mais altos nos indivíduos com o genótipo AA que nos indivíduos portadores do alelo G.

Quando comparado com os parâmetros bioquímicos o mRNA do *TLR2* apresentou uma correlação negativa com a insulina; índice Homa-Beta e triglicérides. E o mRNA do *TNF-α* também apresentou correlação negativa com o triglicérides.

Os estudos de Ghanin e colaboradores mostraram um efeito supressivo potente e rápido de uma dose baixa de infusão de insulina na expressão de TLR2. No presente estudo também foi encontrada uma correlação negativa entre a expressão do gene TLR2 e a concentração de insulina e com o índice HOMA-Beta.

O aumento das concentrações de triglicérides plasmáticas está associado com o aumento das células inflamatórias endoteliais e complicações da aterosclerose. Wang e colaboradores (2009) encontraram que lipoproteínas ricas em triglicerídeos aumentam significativamente a produção de TNF-α comparado com outras classes de lipídeos. Porém no presente estudo foi encontrada uma correlação negativa entre a expressão do gene TNF-α e as concentrações séricas de triglicérides.

5.3 Grupo diabéticos com aterosclerose e diabéticos sem aterosclerose

No grupo de pacientes do grupo diabéticos como esperado foi encontrada uma maior presença de pacientes com aterosclerose (61,8%) que pacientes sem aterosclerose (38,2%), relacionando o DM2 como um fator importante para o desenvolvimento da aterosclerose.

Na análise da relação entre o polimorfismo -174G>C do gene IL-6 e perfil bioquímico em indivíduos do grupo diabéticos com aterosclerose, os indivíduos com o genótipo GG apresentaram valores de glicemia de jejum e glicemia 120 min após sobrecarga de glicose maior que em indivíduos com o genótipo GC+CC, resultado também encontrado na análise desse polimorfismo no grupo diabéticos, e valores de Homa-Beta, colesterol total e LDL-C maiores em indivíduos portadores do alelo C que nos indivíduos com o genótipo GG, resultado também encontrado na análise desse polimorfismo em pacientes com aterosclerose.

E ao analisar o polimorfismo Asp299Gly do gene TLR4 no grupo diabéticos com aterosclerose, observou-se que a glicemia de 120 min após sobrecarga de glicose foi maior nos portadores do alelo A que nos indivíduos com o genótipo AA, como o resultado encontrado ao analisar esse polimorfismo nos pacientes com aterosclerose.

Quando comparado com os parâmetros bioquímicos os mRNA do *IL-6 e do TNF-α* apresentaram uma correlação negativa com o HDL. Fontaine-Bisson e colaboradores também encontraram relação entre o TNF-α e o HDL-C em diabéticos tipo 2, acharam que altas concentrações de TNF-α estão associadas com baixas concentrações de HDL-C circulantes.

5.4 Resultados de estimativa de risco

Indivíduos do gênero masculino apresentaram maior risco de desenvolver DM2.

Mulheres pós-menopausa mostraram ter um fator de risco para o DM2. Após a menopausa, ocorrem modificações na composição do corpo da mulher, especialmente o aumento da gordura corpórea. Citocinas pró-inflamatórias, como o TNF-α e a IL-6 são produzidas pelo tecido adipose e estão implicadas na patogênese da resistência à insulina e diabetes. A partir do aumento da inflamação com o tempo, essas citocinas podem contribuir para a resistência à insulina em mulheres na pós-menopausa. Mudanças no metabolismo da glicose são vistas em mulheres após a menopausa que ocorre no ajuste do declínio nas concentrações de estrogênio, avanço da idade e alterações na distribuição de gordura. Investigações confirmaram que a resistência à insulina é significativamente maior em mulheres pós-menopausa comparado com mulheres pré-menopausa (CHARLES *et al*., 2009; TAMAKOSHI *et al*., 2007).

O DM2 foi relacionado como fator de risco para o desenvolvimento da aterosclerose. Jax e colaboradores (2009) também encontraram essa relação, os eventos cardiovasculares foram significativamente maiores no grupo de pacientes DM2 que nos pacientes normoglicêmicos. Esses resultados são esperados tendo em vista que o diabetes leva a varias alterações metabólicas que podem levar ao desenvolvimento da aterosclerose.

Os genótipos GC+CC do polimorfismo -174G>C gene IL-6 também foram relacionados como fator de risco para o desenvolvimento da aterosclerose. Liu e colaboradores (2006) encontraram em seu estudo resultados semelhantes, seus dados confirmaram que os genótipos GC+CC predizem a doença vascular coronariana.

Limitação do estudo

A limitação desse estudo é o número de pacientes triados até o momento. As dificuldades encontradas nos diabéticos foram durante a triagem dos pacientes, pois, os pacientes têm que ser virgens de tratamento, o que não é fácil de encontrar e, além disso, alguns pacientes não retornavam para a consulta e nem para a realização do ultra-som de carótida.

6. CONCLUSÕES

Não foi possível analisar a associação do polimorfismo Arg753Gln do gene TLR2 e Thr399Ile do gene TLR4 com a aterosclerose e com o DM2, pois estes apresentaram uma freqüência baixa na população estudada.

O alelo C do polimorfismo -174G>C do gene IL-6 mostra estar associado com a aterosclerose.

O alelo G do polimorfismo Asp299Gly do gene TLR4 mostra associação com o DM2 e com aterosclerose.

O genótipo GG no polimorfismo -308G>A do gene TNF-α associou-se com aumento de fibrinogênio, expressão da citocina inflamatória TNF-α.

Os genótipos GC+CC do polimorfismo -174G>C no gene IL-6 no diabético pode ser um marcador de risco para o desenvolvimento da aterosclerose.

Um estudo com casuística maior deve ser conduzido para confirmar os dados obtidos na presente pesquisa.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, K.A.; MUNLANDY, S.; ISMALL, I.S. N^{ε}-(carboxymethyl)lysine and coronary atherosclerosis-associated low density lipoprotein abnormalities in type 2 diabetes: current status. **J Clin Biochem Nutr** v.44, p.14-27, 2009.

ALBERTI, K.G.M.M.; ZIMMET P.Z., for the World Health Organization Consultation. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1:Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Report of a WHO Consultation**.Geneva: WHO; 1999.

AMEZIANE, N.; BEILLAT, T.; VERPILLAT, P.; CHOLLET-MARTIN, S.; AUMONT, M. C.; SEKNADJI, P.; LAMOTTE, M.; LEBRET, D.; OLLIVIER, V. Association of the Toll-like receptor 4 gene Asp299Gly polymorphism with acute coronary events. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** V.23, p.61-7, 2003.

ANTONIADES, C.; TOUSOULIS, D.; MARINOU, K., *et al*. Effects of insulin dependence on inflammatory process, trombotic mechanisms and endotelial function, in pacients with type 2 Diabetes Mellitus and coronary atherosclerosis. **Clin Cardiol** v. 30, p.295-300, 2007.

ARBOUR, N.C.; LORENZ, E.; SCHUTTE, B.C., *et al*. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. **Nature Genetics** v. 25, p.187-191, 2000.

BABSON, AL.; OLSON, D.R.; PALMIERI, T., *et al*. The IMMULITE assay tube: a new approach to heterogeneous ligand assay. **Clin Chem**. v. 37, n. 9, p.1521-2, 1991.

BAGAROLLI, R.A.;SAAD, M.J.; SAAD, S.T. Toll-like receptor 4 and inducible oxid nitric syntase gene polymorphisms are associated with type 2 diabetes. **J. Diabetes Complication,** 2009.

BATSIS, J.A.; NIETO-MARTINEZ, R.E.; LOPEZ-JIMENEZ, F. Metabolic Syndrome: From Global Epidemiology to Individualized Medicine. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**. v. 82, n. 5, p. 509-524, 2007.

BERG, K.K.; MADSEN, H.O.;GARRED, P.; WISETH, R.; GUNNES, S.S.; VIDEM, V. The additive contribution from inflammatory genetic markers on severity of cardiovascular disease. **Clinical Immunology** v. 69, p.36-42, 2009.

BERRY, C.; TARDIF, J.; BOURASSA, M.G. Coronary heart disease in patients with diabetes. **J Am College Cardiol** v. 49, n. 6, p.631-42, 2006.

BOEKHOLDT, S.M.; AGEMA, W.R.P.; PETERS, R.J.G., *et al*. Variants of Toll-like receptor 4 modify the efficacy of statin therapy and the risk of cardiovascular events. **Circulation** v.107, p.2416-2421, 2003.

BUSTIN, S.A., Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **J Mol Endocrinol**., v. 25, n. 2, p.169-193, 2000.

CHARLES, C.; YUSKAVAGE, J., CARLSON, O., *et al.* Effects of High-Dose Isoflavones on Metabolic and Inflammatory Markers in Healthy Postmenopausal Women. **Menopause.** v.16, p.395-400, 2009.

DASU, M.R.; DEVARAJ, S.; ZHAO, L.; HWANG, D.H.; JIALAL, I. High glucose induces Toll-like receptor expression in human monocytes. **Diabetes** v. 57, p.3090-3098, 2008.

FERNÁNDEZ-REAL, J.M.; BROCH, M.; VENDRELL, J.; RICHART, C.; RICART, W. Interleukin-6 gene polymorphism and lipid abnormalities in healthy subjects. **J.Clin. Endocr. Metab.,** v.85, p.1334-9, 2000.

FOLWACZNY, M.; GLAS, J.; TÖRÖK, H.P., *et al.* Toll-like receptor (TLR) 2 and 4 mutations in periodontal disease. **Clin Exp Immunol** v.135, p.330-335, 2004.

FONTAINE-BISSON, B.; WOLEVER, T.M.S.; CHIASSON, J.; *et al*. Genetic polymorphisms of tumor necrosis factor-_ modify the association between dietary polyunsaturated fatty acids and fasting HDL-cholesterol and apo A-I concentrations. **Am J Clin Nutr** v.86, p.768-74, 2007.

FRANCIS, K.; PHAM, M.; LUTTRELL, I., *et al.* Toll-like receptor-4 mediates vascular inflammation and insulin resistance in diet-induced obesity. **Circ res** v.100, p.1589-96, 2007.

FREEMAN, D.J.; NORRIE, J.; CASLAKE, M.J.; *et al.* C-reative protein is an independent predictor of risk for the development of diabetes in West of Scotland Coronary Prevention Study. **Diabetes** v.51, p.1596-600, 2002.

FRIEDWALD, W.T.; LEVY, R.I.; FREDRICKSON, D.S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein – an integrated approach to mechanisms and disorders. **N Engl J Med** v. 276, n. 32, 1967.

GHANIN, H.; MOHANTY, P.; DEOPURKAR, R.; *et al*. Acute Modulation of Toll-Like Receptors by Insulin. **Diabetes Care** v.31, p1827–1831, 2008.

GOMES, M.B. Glitazonas e síndrome metabólica: mecanismos de ação, fisiopatologia e indicações terapêuticas. **Arq Bras Endocrinol Metab** v. 50, n. 2, p.271-280, 2006.

HAJER, G.R.; van HAEFTEN, T.W.; VISSEREN, F.L.J. Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. **European Heart Journal,** v.29, n.24, p.2959-71, 2008.

HICKMAN, I.J.;MACDONALD, G.A. Diabetes on the Severity of Liver Disease. **Am J Med.** v.120, n. 10, p. 829-834, 2007.

INSULL, W. The patology of aterosclerosis: palque development and plaque responses to medical treatment. **Am J Med** v.122, p. 2-14, 2009.

JAFFE, M.Z. **Physiol Chem**. v. 10, p. 391-400, 1866.

JAX, T.W.; PETERS, S. J.; PLEHN, G.; SCHOEBEL, F. Hemostatic risk factors in patients with coronary artery disease and type 2 diabetes - a two year follow-up of 243 patients. **Cardiovascular Diabetology**, v.8, p.48, 2009.

JEFFERIS, B.J.; WHINCUP, P.H.; WELSH, P., *et al*. Circulating TNF-α levels in older men and women do not show independent prospective relations with MI or stroke. **Atherosclerosis** , 2008.

KIM, Y.S.; HWANG, Y.J.; KIM, S.Y.; YANG, S.M., *et al.* Rarity of TLR4 Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms in Korean population. **Yonsei med J** v.49, 2008.

KUBASZEK, A.; PIHLAJAMÄKI, J.; KOMAROVSKI, V., *et al.* Promoter polymorphisms of the TNF-α (G-308A) and IL-6 (C-174G) genes predict the conversion from impaired glucose tolerance to type 2 diabetes. **Diabetes** v.52, p.1872-76, 2003.

LABRUM, R.; BEVAN, S.; SITZER, M.; LORENZ, M.; MARKUS, H.S. Toll receptor polymorphism and carotid artery intima-media tickness. **J Am Heart Association** v.38, p. 1-6, 2007.

LIU, Y.; BERTHEIR-SCHAAD, Y.; FALLIN, M. D. IL-6 Haplotypes, Inflammation, and Risk for Cardiovascular Disease in a Multiethnic Dialysis Cohort. **J Am Soc Nephrol**, v. 17, p.863–870, 2006.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. **Methods**, v.25, p. 402-408, 2001.

MADAN, M.; BISHAYI, B.; HOGE, M.; AMAR, S. Atheroprotective role of interleukin-6 in diet- and/or pathogen-associated atherosclerosis using an ApoE heterozygote murine model. **Atherosclerosis** v.197, p. 504-514, 2008.

MATSUMOTO, K.; FUJITA, N.; NAKAMURA, K., *et al.* Apolipoprotein B and insulin resistance are good markers of carotid atherosclerosis in patients with type 2 diabetes mellitus. **Diab Res Clin Prat**, v. 82, n.1, p.91-7 2008.

MATTHEWS, D.R.; HOSKER, J.P.; RUDENSKI, A.S., *et al*. Homeostasis model assessment: insulin resistance and betacell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. **Diabetologia**, v. 28, p. 412–419, 1985.

MAZZANE, T.; CHAIT, A.; PLUTZKY, J. Cardiovascular disease risk in type 2 diabetes mellitus: insights from mechanistic studies. **Lancet** v.371, p. 1800-09, 2008.

MERX, S.; NEUMAIER, M, WAGNER, H.; KIRSCHINING C.J.; AHMAD-NEJAD, P. Characterization and investigation of single nucleotide polymorphisms and novel TLR2 mutation in the human TLR2 gene. **Human Molecular Genetics,** v.16, p.1225-32, 2007.

PAIVA, D.C.P.; BERSUSA, A.A.S.; ESCUDER, M.M.L. Avaliação da assistência aopaciente com diabetes e/ou hipertensão pelo Programa Saúde da Família do Município de Francisco Morato, São Paulo, Brasil. **Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro.** v. 22, n.2, p.377-385, 2006.

PASTERKAMP, G.; VERSTEEG, D.; KLEIJIN, D.P.V. Immune regulatory cells: circulating biomarker factories in cardiovascular disease. **Clinical Science** v.115, p. 129-131, 2008.

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res.** V. 29, P.2003-2007, 2001.

RAZANI, B.; CHAKRAVARTHY, M.V.; SEMENKOVICH, C.F. Insulin resistence and atherosclerosis. **Endocrinol Metab Clin N Am** v.37, p. 603-621, 2008.

RUDOFSKY, G.; REISMANN, P.; WITTE, S., *et al*. Asp299Gly and Thr399Ile genotypes of the TLR4 gene are associated with a reduced prevalence of diabetic neuropathy in patients with type 2 diabetes. **Diabetes Care,** v. 27, p.179-183, 2004

SALAZAR, L.A.; HIRATA, M.H.; CAVALLI, S.A., *et al*. Optimized procedure for DNA isolation from fresh and cryopreserved clotted human blood useful in clinical molecular testing. **Clin Chem** v.44, p. 1748-50, 1998.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. A single-step method for the simultaneous preparation of DNA, RNA, and protein from cells and tissues. In: **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3ª ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001, cap. 7, p. 7.9-7.12b

SAMBROOK, J.; RUSSEl, D.W. Agarose gel electrophoresis. In: **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3ª ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001, cap. 7, p. 743-7.45a.

SATOH, M.; ISHIKAWA, Y.; MINAMI, Y.; TAKAHASHI, Y.; NAKAMURA, M. Role of Toll-like receptor signaling pathway in ischemic coronary artery disease. **Frentiers in Bioscience** v.13, p.6708-6715, 2008.

SHWARTZ, D. A.; COOK, D. N. Polymorphisms of toll-like receptors and human disease. **Clin. Infect. Diseases,** v.41, p.403-7, 2005.

SCHWARTZ, E.A.; REAVEN, P.D. molecular and signaling mechanisms of atherosclerosis in insulin resistance. **Endocrinol Metab Clin N Am** v.35, p.525-549, 2006.

SHI, H.; KOKOEVA, M.V.; INOUYE, K.; *et al.* TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. **J Clin Invest** v.116, p.3015-25, 2006.

SHIAN, M.Y.; WU, C.Y.; HUANG, C.N.; HU, S.W*, et al.* TNF-α polymorphisms and type 2 diabetes mellitus in Taiwanese patients. **Tissue Antigens**, v.61, p.393-97, 2003.

SIEDEL, J.; *et al.* **AACC Meeting Abstract 34**. **Clin Chem**. v.39, n.1127, 1993.

SIEDEL, J.; HAGELE, E.O.; ZIEGENHORN, J.; *et al.* **Clin Chem**. v.29, n. 1075, 1983.

SKELLY, A.H. Type 2 Diabetes Mellitus. **Nursing Clinics of North America**, v. 41, p 531-547, 2006.

SOOKOIAN, S.C.; GONZÁLEZ, C.; PIROLA C.J. Meta-analysis on the G-308A Tumor Necrosis Factor α gene variation and phenotypes associated with the metabolic syndrome. **Obesity Research,** v.13, 2005.

STEINHADT, A.P.; ARANGUREN, F.; TELLECHEA, M.L. *et al.* A functional nonsynonymous toll-like receptor 4 gene polymorphism is associated with metabolic syndrome, surrogates of insulin resistance, and syndromes of lipid accumulation. **Metabolism**, 2009.

STEPHENS, J.W.; HUREL, S.J.; LOWE, G.D.O.; *et al.* Association between plama IL-6, the IL-6 -174G>C gene variant and the metabolic syndrome in type 2 diabetes mellitus. **Molecular Genetics and Metabolism** v.90, p 422-428, 2007.

SUGIUCHI H.; UJI Y.; OKABE, H.; IRIE T. *et al*. Direct measurement of high-density lipoprotein cholestrol in serum with polyethylene glycol-modified enzymes and sulfated α-ciclodextrin. **Clin. Chem**. v.41, p. 717-23, 1995.

TALKE, H.; SHUBERT, G.E. Enzymatic urea determination in blood and serum in the Warburg optical test. **Klin Wochenschr**. v. 43, n. 1, p. 174-5, 1965.

TAMAKOSHI K.; YATSUYA H.; WADA K, MATSUSHITA K., *et al*. The transition to menopause reinforces adiponectin production and its contribution to improvement of insulin-resistant state. **Clin Endocrinol**, v.66, p.65–71, 2007.

TANIGUCHI, A.; FUKUSHIMA, M.; NAKAI, Y.; *et al.* Factores responsible for the evolution of insulin resistance in japanese type 2 diabetic patients: Association with atherosclerosis. **Diab Res Clin Pract** v.77, p. 213-9, 2007.

TILG, H.; MOSCHEN, A.R. Inflammatory mechanisms in the regulation of insulin resistance. **Mol Med** v.14, p.222-231, 2008.

TRINDER, P. Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. **J Clin Pathol**. v.22, p.158-61, 1969.

VEJA, M.T.M.; MARTÍN, A.A. Toll-like receptors: a family of innate sensors of danger that alert and drive immunity. **Allergol et immunopathol** v.36, n.6, p.347-57, 2008.

VAXILLAIRE, M.; VESLOT, J.; DINA, C.; *et al.* Impact of common type 2 diabetes risk polimorphisms in the DESIR prospective study. **Diabetes** v.57, p.244-54, 2008.

WANG, L.; GILL, R.; PEDERSEN, T. L., *et al.* Triglyceride-rich lipoprotein lipolysis releases neutral and oxidized FFAs that induce endothelial cell inflammation. **J. Lipid Res.** v.50, p.204-213, 2009.

WENZEL, K. W. Pharmacological interference with in vitro tests of thyroid function. **Metabolim**. v. 30, n.7, p. 717-732, 1981.

8. ANEXOS

ANEXO A
CÓPIA DA FICHA DO ALUNO

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

9136 - 5842749/1 - Fernanda Abujamra da Silva

Email:	feabujamra@usp.br
Data de Nascimento:	25/05/1983
Cédula de Identidade:	RG - 34.716.072-4 - SP
Local Nascimento:	Estado de São Paulo
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Bacharel em Biomedicina - Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas - - São Paulo - Brasil - 2007

Curso:	Mestrado em Farmácia
Área:	Análises Clínicas
Data da Matrícula:	30/05/2007
Início da Contagem de Prazo:	30/05/2007
Data Limite:	30/03/2010
Orientador(es):	Prof(a). Dr(a). Dulcineia Saes Parra Abdalla - 30/05/2007 a 19/09/2007 E.Mail: dspa@usp.br Prof(a). Dr(a). Mario Hiroyuki Hirata - 20/09/2007 a -- E.Mail: mhhirata@usp.br
Prorrogação:	120 dias Período de 30/11/2009 a 30/03/2010
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 22/05/2009
Data do Depósito do Trabalho:	
Data máxima para aprovação da Banca:	
Título do Trabalho:	
Data de Aprovação da Banca:	
Data Máxima para Defesa:	
Data da Defesa:	
Resultado da Defesa:	
Histórico de Ocorrências:	Ingressou no Mestrado em 30/05/2007 Prorrogação em 02/10/2009 Matrícula de Acompanhamento em 08/02/2010

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Hor.	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Sit. Matric.
FBC5757-1	Seminários em Análises Clínicas II	06/08/2007	18/11/2007	30	2	80.00	A	N	Concluída
FBC5764-4	Protídeos em Bioquímica Clínica	03/10/2007	30/10/2007	60	4	100.00	A	N	Concluída
FBC5756-1	Alterações moleculares na doença renal crônica	08/10/2007	29/10/2007	45	3	100.00	A	N	Concluída
FBA5728-2	Aprimoramento Didático	06/11/2007	04/12/2007	60	0	0.00	-	N	Pré-matrícula indeferida
FBT5776-3	Seminários Gerais de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica II	11/02/2008	24/02/2008	30	2	100.00	A	N	Concluída
FBC5761-5	Tópicos Avançados em Bioquímica Clínica	03/03/2008	30/03/2008	60	4	85.00	A	N	Concluída
FBC5793-8	Seminários em Análises Clínicas	11/03/2008	23/06/2008	30	2	87.00	A	N	Concluída
FBA5728-2	Aprimoramento Didático	06/05/2008	02/06/2008	60	4	85.00	A	N	Concluída
FBC5716-5	Tuberculose: Métodos Laboratoriais Clássicos e de Biologia Molecular na Detecção, Identificação e no Diabéticosde resistência de Mycobacterium spp Patogênicos	23/06/2008	13/07/2008	90	6	90.00	A	N	Concluída

Créditos mínimos exigidos	Para Exame de Qualificação	Para Depósito de Dissertação/Tese	Créditos obtidos	
Disciplinas:	25	25	**Disciplinas:**	27
Atividades Programadas:	0	0	**Atividades Programadas:**	0
Seminários:	0	0	**Seminários:**	0
Estágios:	0	0	**Estágios:**	0
Total:	25	25		27

ANEXO B
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de pesquisa: “Associação da aterosclerose com polimorfismo de TLR2, TLR4, TNF-α e IL-6 e sua expressão em pacientes diabéticos tipo 2”.

Dados de identificação do voluntário da pesquisa:
Iniciais do paciente: _____
Documento de identidade nº_____
Sexo: _____
Data de nascimento: _____/_____/_____
Telefone_____
_____

Prezado Paciente,

Você está sendo convidado a participar do projeto de pesquisa acima citado que estamos desenvolvendo com a equipe de médicos da Seção de Coronária do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia – IDPC. Não há beneficio direto aos pacientes da pesquisa. Os resultados deste diabéticoscontribuirão para o conhecimento dos efeitos de polimorfismos dos genes TLR2, TLR4, IL-6 e TNF-α, importantes na inflamação, sobre a expressão de mRNA e sua relação com aterosclerose em indivíduos com diabete tipo 2, analisando assim se esses genes podem funcionar como marcadores para o risco de desenvolvimento de aterosclerose.

Para participar desta pesquisa precisarei do seu consentimento e serão necessários suas amostras de sangue e um ultra-som de carótida, que serão coletadas no Setor de Coleta do Laboratório Clínico do IDPC e na hemodinâmica por um médico do IDPC, respectivamente. O risco à saúde será mínimo, a coleta de sangue pode formar uma mancha roxa (hematoma) no local da picada da agulha. O ultra-som não apresentará nenhum risco a sua saúde.

Além de você, outros pacientes também participarão do estudo. Precisarei, ainda, que você responda algumas perguntas sobre doenças existentes nas pessoas de sua família, hábitos e uso de medicamentos.

Serão coletadas amostras de sangue para exames laboratoriais e para obtenção de DNA (polimorfismo genético) e de RNA (expressão gênica), e também será realizado o ultra-som de carótida para observar se existe a presença de aterosclerose de carótida, e sua participação no diabéticosse encerrará.

Você receberá todos os resultados dos exames laboratoriais necessários sem qualquer custo, que são: hemograma, HbA_{c1} glicose, colesterol total e frações (perfil lipídico), uréia e creatinina (função dos rins), T4 e TSH (tireóide), ALT e AST (função do fígado), PCRus, fibrinogênio, TNF-α e IL-6 (inflamação). Você não receberá qualquer

pagamento por sua participação. Caso seja de seu interesse, também disponibilizarei os resultados da análise genética no final da pesquisa.

Os dados obtidos durante a investigação serão confidenciais e não serão revelados a terceiros, a menos que sua autorização prévia seja obtida. Sua identidade será mantida em segredo, quando os resultados desse diabéticosforem publicados em revistas, artigos a serem tema de debates e aulas.

O RNA e o DNA (moléculas que carregam informações genéticas) extraído de seu sangue será armazenado e ficara sob responsabilidade do Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP. Caso haja interesse de realizarmos futuras pesquisas entraremos em contato com você, e somente com sua autorização e aprovação dos novos projetos no Comitê de Ética em Pesquisa realizaremos os estudos.

Sua participação neste diabéticosé voluntária. Você pode retirar-se a qualquer momento do diabéticose pegar sua amostra de volta, sem penalidades ou perda dos benefícios a que você tem direito e seu tratamento médico no Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia não será afetado.

Por quaisquer motivos adequados, independentes de seu consentimento, os membros da equipe de pesquisa podem encerrar sua participação no estudo. O motivo lhe será explicado e poderá ser devido a alguma alteração médica que pode colocá-lo em risco de outra complicação se continuar à participação, cancelamento do diabéticospela coordenação do estudo, caso o sujeito não cumpra as orientações ou outras questões administrativas.

Ao assinar este termo você não abre mão de nenhum direito legal. Caso você tenha alguma dúvida em relação à pesquisa, ou se ocorrer lesão relacionada à investigação você poderá entrar em contato com os pesquisadores Mário Hiroyuki Hirata (Av. Prof. Lineu Prestes, 580, tel.: 3091-3660), Fernanda Abujamra da Silva (tel.: 5085-6086), a qualquer hora do dia.

Em caso de dúvidas ou preocupações quanto aos seus direitos como participante deste estudo, você pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia no telefone 5085-6040.

Eu, _____declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, aceito, voluntariamente, em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo, _____de_____ de 20_____.

_____ _____

Assinatura do sujeito da pesquisa

Assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome legível)

Uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será fornecida para você pelo pesquisador

ANEXO C
Carta de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

Ofício CEP nº 103/2007

São Paulo, 28 de agosto de 2007.

Ilmo(a). Sr(a).
Prof. Dr. Mario Hiroyuki Hirata
FBC

Prezado(a) Senhor(a),

O Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião realizada em 27 de agosto de 2007, **APROVOU** o projeto "Associação da aterosclerose com polimorfismo de TLR2, TLR4, TNF-alpha e IL-6 e sua expressão em pacientes diabéticos tipo 2" (Protocolo CEP nº 442) apresentado por Vossa Senhoria.

Lembramos que após a execução de 50% do cronograma do projeto, deverá ser apresentado um relatório parcial, de acordo com o Artigo 18 – item C, da Portaria FCF-111/97.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara
Coordenadora do Comitê de Ética Pesquisa
FCF/USP

Av. Prof. Lineu Prestes, nº 580, Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone / Fax: (11) 3091-3677 - e-mail: cepfcf@usp.br

ANEXO D
Carta de Aprovação do CEP do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia

Comitê de Ética em Pesquisa

Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia
Fundação Adib Jatene

ENTRADA: 25 de maio de 2007. **1ª AVALIAÇÃO**: 05 de junho de 2007.

2ª AVALIAÇÃO: 03 de julho de 2007. **AVALIAÇÃO FINAL:** 07 de agosto de 2007.

CAEE: 0042.0.131.000-07

N. º DO PROTOCOLO NO CEP: 3528.

(ESTE N. º DEVERÁ CITAR NAS CORRESPONDÊNCIAS REFERENTES A ESTE PROJETO)

PESQUISADOR PRINCIPAL: Prof. Titular Mario Hiroyuki Hirata.

COLABORADORES: Milano F.dos S.F. Marques; Simone L. Barroso; Valéria F. da Silva; Carla P. Pastorelli; Silvia T. Himelfarb; Lídio G. da L. Neto; Rosário D. C. Hirata; Fernanda A. da Silva; Dr. Dikran Armaganijan; Dr. Marcelo F. Sampaio; Dra. Maria Isabel D. Mônaco.

PROJETO DE PESQUISA: "Associação da Aterosclerose com Polimorfismo de TLR2, TLR4, TNF-Alpha e IL-6 e sua Expressão em pacientes Diabéticos Tipo 2 ".

DURAÇÃO DA PESQUISA: 02 anos.

N.º DE PARTICIPANTES NO CENTRO: 200

Ao se proceder à análise ao projeto em questão, considera-se que:

a) O projeto respondeu as solicitações da pendência anterior;

b) Preenche os requisitos fundamentais das resoluções CNS 196/96, 251/97 e 292/99, sobre as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos, do Conselho Nacional de Saúde / Conselho Nacional de Ética em Pesquisa / Agência Nacional de Vigilância Sanitária e as Boas Práticas de Pesquisa Clínica do ICH-GCP.

c) O Comitê de Ética em Pesquisa avaliou o Protocolo de Estudo e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

d) O Comitê de Ética em Pesquisa segue os preceitos das resoluções CNS196/96, 251/97 e 292/99, sobre as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos, do Conselho Nacional de Saúde / Conselho Nacional de Ética em Pesquisa / Agência Nacional de Vigilância Sanitária e as Boas Práticas de Pesquisa Clínica do ICH-GCP.

AV.DR.DANTE PAZZANESE,500-PRÉDIO I- -IBIRAPUERA-04012-180-S.P
Telefax:(11) 5085-6040 cepidpc@terra.com.br

Comitê de Ética em Pesquisa

Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia
Fundação Adib Jatene

Diante do exposto, O Comitê de Ética em Pesquisa, manifesta-se pela:

- Protocolo de Estudo versão I: Aprovado.
- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Versão I: Aprovado.

O Comitê de Ética em Pesquisa, solicita que:

a. Enviar primeiro relatório parcial em 02/2008
b. Informar imediatamente relatório sobre qualquer evento adverso ocorrido
c. Comunicar qualquer alteração no projeto e no TCLE.

Situação: Protocolo Avaliado e Aprovado em reunião ordinária no dia 14 de agosto de 2007.

São Paulo, 14 de agosto de 2007.

Pedro Silvio Farsky
Coordenador CEP
CRM 55073

AV.DR.DANTE PAZZANESE,500-PRÉDIO I- -IBIRAPUERA-04012-180-S.P
Telefax:(11) 5085-6040 cepidpc@terra.com.br

ANEXO E
FICHA PARA COLETA DE DADOS INDIVIDUAIS

DADOS DO PACIENTE

Nome:_____ Paciente nº:_____
Data:_____/_____/_____ Registro nº:_____
Data de nascimento:_____/_____/_____
Cor: ( )Branco ( ) Negro ( ) Pardo ( ) Amarelo
Sexo: ( )feminino ( ) masculino Estado civil:_____
Endereço:_____
_____
_____
Telefone:_____
_____

- Hipertensão arterial ( ) sim ( ) não

- Diabetes ( ) sim; Tipo 1 ( ) ( ) não
Tipo 2 ( )

- Dislipidemias ( ) sim; LDL_____ ( ) não
TG_____

- Doença auto-imune ( ) sim ( ) não

- Cateterismo ( ) sim; ano_____ ( ) não

- Uso de medicamentos:
_____
_____
_____

- Observações:
_____
_____
_____

HISTÓRICO FAMILIAR

_____
_____
_____

HÁBITOS

- Tabagismo ( ) sim ; Atual_____ (carga) ( ) não
Passado_____ (tempo)

- Bebida alcoólica ( ) sim; frequentemente ( ) sim ( ) não

- Atividade física ( ) sim; frequentemente ( ) sim ( ) não

- Stress ( ) sim ( ) não

EVENTOS CORONARIANOS

- Angina estável/instável ( ) sim; tempo_____ ( ) não

- Infarto agudo ( ) sim; tempo_____ ( ) não

EXAME FÌSICO (prévio)

Peso_____Kg Altura_____cm IMC_____
PA_____mmHg Cintura _____cm Quadril_____cm

ANEXO F
CURRÍCULO LATTES

Fernanda Abujamra da Silva

Dados pessoais

Nome: Fernanda Abujamra da Silva

CPF: 32601106824

Endereço profissional: Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas,
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Av. Prof. Lineu Prestes 580 Bloco 17-Laboratório de Biologia Molecular
Aplicada ao Diagnóstico
Cidade Universitária
05508-000 - São Paulo, SP - Brasil
Telefone: (11) 30913660

Endereço eletrônico: fe.abujamra@hotmail.com

Formação Acadêmica/Titulação

2007 Mestrado em Ciências Farmacêuticas (Análises Clínicas)
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
Título: Associação da aterosclerose com polimorfismo de TLR2, TLR4, TNF-α e IL-6 e sua expressão em pacientes diabéticos tipo 2
Orientador: Mario Hiroyuki Hirata
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
Palavras-chave: aterosclerose; diabete tipo 2; TLR; IL-6; TNF-alpha
Grande área: Ciências Biológicas / *Área:* Bioquímica / *Subárea:* Biologia Molecular

2003 – 2006 Graduação em biomedicina.
Unifmu.

Atuação profissional

Universidade de São Paulo, USP, Brasil
Vínculo institucional
2006 – 2006 Vínculo: estágio, Enquadramento Funcional: aluno, Carga horária: 30

Unifmu, UNIFMU, Brasil.
Vínculo institucional
2003 – 2006 Vínculo: aluno, Enquadramento Funcional: aluno, Carga horária: 12

Atividades

08/2006 - 12/2006 Estágios , UniFMU - Laboratório de Análises Clínicas
Estágio nos setores de hematologia, parasitologia, uranálise, bioquímica e citologia oncótica

03/2005 - 09/2005 Atividades de Participação em Projeto, UniFMU - Biologia Molecular
Projeto de pesquisa: Análises comparativas de sequências gênicas e protéicas da molécula P40 de isolados de Herpes vírus

08/2004 - 11/2004 Estágios , Laboratório Multidisciplinar - UniFMU
estágio no laboratório Multidisciplinar (rodízio) da UniFMU

Produção em C,T & A

Produção bibliográfica

Resumos publicados em anais de congressos

1. Hirata, M. H. ; Marques, M. F. S. F. ; Himelfarb, S. T. ; Rodrigues, A. C. ; SILVA, F. A. ; Silva, V. F. ; Del Monaco, M. I. ; Sampaio, M. F. ; Dinkhuysen, J. J. ; Bertolami, M. C. ; Armaganijan, D. ; Hirata, R. D. C. . Effects of pioglitazone on total PPARG, PPARG2, SUR1 and KIR6.2 mRNA expression in peripheral blood leukocytes from individuals with type 2 diabetes mellitus. In: AACC Annual Meeting 2008, 2008, Washington, DC. American Association for Clinical Chemistry - Annual Meeting, 2008. Washington, DC : American Association for Clinical Chemistry, 2008. v. 54. p. 1-249.

2. Hirata, M. H. ; SILVA, F. A. ; Lima-neto, L. G. ; Luchessi, A. D. ; Silbiger, V. N. ; Rodrigues, A. C. ; Bertolami, M. C. ; Tavares, V. ; Rezende, A. A. ; Doi, S. Q. ; Sampaio, M. F. ; Armaganijan, D. ; Hirata, R. D. C. . IL-6 -174G>C gene polymorphism can be a marker of type 2 diabetes mellitus. In: AACC Annual Meeting, 2009, Chicago. Clinical Chemistry, 2009. v. 55. p. 223.

3. Hirata, M. H. ; Himelfarb, S. T. ; Marques, M. F. S. F. ; SILVA, F. A. ; Rodrigues, A. C. ; Sampaio, M. F. ; Dinkhuysen, J. F. ; Bertolami, M. C. ; Armaganijan, D. ; Silva, V. F. ; Rezende, A. A. ; Del Monaco, M. I. ; Hirata, R. D. C. . Thiazolidinediones and its negative effects on bone metabolism in Brazilian individuals with type 2 diabetes mellitus. In: AACC Annual Meeting, 2009, Chicago. Clinical Chemistry, 2009. v. 55. p. 223.

4. SILVA, F. A. ; Saleh, M. H. ; Sampaio, M. F. ; Himelfarb, S. T. ; Bertolami, M. C. ; Del Monaco, M. I. ; Souza, A. G. M. R. ; Armaganijan, D. ; Hirata, R. D. C. ; Hirata, M. H. . Association of the Atherosclerosis with TLR2, TLR4 e IL-6 Polymorphism in Type 2 Diabetics Patients. In: XII Congresso Brasileiro de Aterosclerose, 2009, Campinas. Atherosclerosis - supplements, 2009. v. 10. p. 14-15.

5. Hirata, M. H. ; Marques, M. F. S. F. ; Himelfarb, S. T. ; Rodrigues, A. C. ; SILVA, F. A. ; Silva, V. F. ; Del Monaco, M. I. ; Sampaio, M. F. ; Dinkhuysen, J. J. ; Bertolami, M. C. ; Armaganijan, D. ; Hirata, R. D. C. . Effects of pioglitazone on total PPARG, PPARG2, SUR1 and KIR6.2 mRNA expression in peripheral blood leukocytes from individuals with type 2 diabetes mellitus. In: AACC Annual Meeting 2008, 2008, Washington, DC. American Association for Clinical Chemistry - Annual Meeting, 2008. Washington, DC : American Association for Clinical Chemistry, 2008. v. 54. p. 165-166.

Apresentação de trabalho

1. SILVA, F. A. ; Saleh, M. H. ; Sampaio, M. F. ; Himelfarb, S. T. ; Bertolami, M. C. ; Del Monaco, M. I. ; Souza, A. G. M. R. ; Armaganijan, D. ; Hirata, R. D. C. ; Hirata, M. H. . Associação da aterosclerose com polimorfismo de TLR2, TLR4 e IL-6 em pacientes diabéticos tipo 2. 2009. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

Eventos

Participação em eventos

1. XII Congresso Brasileiro de Cardiologia.Associação da Aterosclerose com polimorfismo de TLR2, TLR4 e IL-6 em pacientes diabéticos tipo 2. 2009. (Congresso).
2. 65º Curso Intensivo de Cardiologia. 2007. (Congresso).
3. II Curso de Biologia Molecular. 2007. (Simpósio)
4. 6º congresso nacional de iniciação científica.Herpes vírus: proteína viral P40 como marcadora de isolados de primatas e humanos. 2006. (Congresso).
5. II Internacional Workshop of Vascular Biology. 2006. (Congresso).
6. IX Congresso Brasileiro de Biomedicina. 2004. (Congresso).
7. I Encontro de Biomedicina. 2003. (Congresso).
8. Biotecnologia de Microrganismo. 2003. (Outra).